REGULATION DER TRANSKRIPTION UND DES RNA–TRANSPORTS HÖHERER PFLANZEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard–Karls–Universität Tübingen

vorgelegt von

KLAUS GROSSMANN

aus Heilbronn / N.

1980

REGULATION DER TRANSKRIPTION UND DES RNA–TRANSPORTS HÖHERER PFLANZEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard–Karls–Universität Tübingen

vorgelegt von

KLAUS GROSSMANN

aus Heilbronn / N.

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1980

Dekan: Prof. Dr. W. Seyffert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. U. Seitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Hager

---

gedruckt bei H.- J. Köhler, Reprografie Betrieb, Tübingen

Ein Sandkorn ist der Erdball, rufst du aus
und blickst ergriffen auf den Sternensaus.
Dann wendest du dich um und lauschst beim Tee
den Professoren A und B und C.
Und siehe da, auf deinem Körnchen Sand
erhebt sich Wissenschaft, ein Elefant.
Das Korn bleibt Korn. Du aber, gläubig, munter,
du bringst den Elefanten auf ihm unter.
Und liegst davor sogar noch auf den Knien;
das Sandkorn trägt geduldig dich und ihn.
Aber trotz Gelehrsamkeit und Hochgefühl:
Ihr seid nicht größer als - ein Molekül.

Christian Morgenstern

Regina und meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 6
2.1. Zellmaterial und Kulturbedingungen 6
2.2. Präparation und Reinigung der Zellkerne 6
2.3. Präparation und Reinigung von Chromatin 7
2.4. DNA-Isolierung 7
2.5. Isolierung und Reinigung von RNA-Polymerase I aus Petersilie-Suspensionszellen 8
2.5.1. Vorbereitung der Ionenaustauscher 8
2.5.2. Bestimmung des Brechungsindexes und des Proteingehalts 8
2.5.3. Isolierung der RNA-Polymerase I aus Chromatin 9
2.5.3.1. Chromatinpräparation 9
2.5.3.2. "Batch"-Verfahren 9
2.5.3.3. Phosphocellulose-Chromatographie (PC 1) 1o
2.5.3.4. DEAE-Cellulose-Chromatographie (DE) 1o
2.5.3.5. Phosphocellulose-Chromatographie (PC 2) 1o
2.5.3.6. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation 1o
2.5.4. Polyacrylamidgel-Elektrophorese 11
2.6. Isolierung und Reinigung von RNA-Polymerase I aus Sojabohnen 11
2.7. RNA-Polymerase aus Escherichia coli MRE 6oo 11
2.8. In vitro-Transkription mit isolierten Zellkernen der Petersilie 11
2.8.1. Inkubationsbedingungen 11
2.8.2. Aufarbeitung der in vitro-Transkriptionsprodukte 12
2.9. In vitro-Transkription mit Petersilie-RNA-Polymerase I 12
2.9.1. Standard-Inkubationsbedingungen 12
2.9.2. Aufarbeitung der in vitro-Transkriptionsprodukte 13

2.1o. In vitro-Transkription mit Sojabohnen-RNA-Polymerase I 13
2.1o.1. Standard-Inkubationsbedingungen 13
2.11. In vitro-Transkription mit E.coli-RNA-Polymerase 13
2.11.1. Standard-Inkubationsbedingungen 14
2.12. Auftrennung der in vitro-synthetisierten RNA mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese 14
2.13. Affinitätschromatographie von Sojabohnen-RNA-Polymerase I an Plasmid-DNA mit Sojabohnen-rRNA-Genen als "Insert" 15
2.13.1. Kopplung von Plasmid-DNA an CNBr-aktivierter Sepharose 15
2.13.2. Affinitätschromatographie 15
2.14. Darstellung der RNA-Polymerase I an DNA im Elektronenmikroskop 15
2.15. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität der isolierten Petersilie-Zellkerne 16
2.16. Puffer und Lösungen 16
2.17. Chemikalien und Abkürzungen 18
2.17.1. Chemikalien 18
2.17.2. Abkürzungen 19

3. Ergebnisse 22
3.1. Petersilie-Suspensionskultur 22
3.2. Zellkernisolierung aus Petersilie-Suspensionszellen 23
3.3. Isolierung und Reinigung von RNA-PolymeraseI aus Petersilie 25
3.3.1. Polyacrylamidgel-Elektrophorese 29
3.3.2. Auftrennung von Sojabohnen-RNA-Polymerase I an rDNA-Sepharose 31
3.4. Charakterisierung der RNA-Polymerase I aus Petersilie 32
3.4.1. Kinetik und Enzymkonzentration 32
3.4.2. Matrizen-DNA 33
3.4.3. Einfluß von divalenten Kationen und Ionenstärke auf die RNA-Polymerase I-Aktivität 35
3.4.3.1. Kontrollversuche 36

3.4.4. Einfluß von 3', 5'-cAMP, GA_3 und IES auf die Petersilien-RNA-Polymerase I 37
3.4.5. Elektrophoretische Untersuchung der in vitro-Transkriptionsprodukte 37
3.4.6. Darstellung der an DNA gebundenen Petersilien-RNA-Polymerase I im Elektronenmikroskop 39
3.5. Charakterisierung der RNA-Polymerase I isoliert aus der Sojabohne 40
3.5.1. Kinetik und Enzymkonzentration 40
3.5.2. Abhängigkeit von divalenten Kationen 40
3.5.3. Einfluß der $(NH_4)_2SO_4$- und KCl-Konzentration 40
3.6. Charakterisierung der RNA-Polymerase aus E.coli 43
3.7. Phosphatase-Aktivität in isolierten Petersilie-Zellkerne 45
3.7.1. Substratabhängigkeit 45
3.7.2. Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und vom pH-Wert 46
3.7.3. Überprüfung der Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die Phosphatase-Aktivität 48
3.7.4. Einfluß von Phytohormonen und deren Analoge auf die Phosphatase-Aktivität 48
3.8. Bestimmung der in vitro-Transkription und des Transports synthetisierter RNA bei isolierten Petersilie-Zellkernen 48
3.8.1. Einfluß von divalenten Kationen und Nucleosidtriphosphaten auf den RNA-Transport 49
3.9. Einfluß von divalenten Kationen und Nucleosidtriphosphaten auf die Petersilien-RNA-Polymerase I-Aktivität 51
3.1o. Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die RNA-Synthese isolierter Kerne und RNA-Polymerase I in Beziehung zu der Phosphatase-Aktivität bei Petersilie-Zellkernen 57
3.1o.1. Nucleosidtriphosphate variabel, divalente Kationen konstant 57

3.1o.2. Divalente Kationen variabel, Nucleosidtriphosphate konstant 59
3.1o.3. Nucleosidtriphosphat- und divalente Kationenkonzentration im Verhältnis 1:1 61
3.1o.4. Einfluß von Adenosindiphosphat 63
3.1o.5. Einfluß von Orthophosphat und Pyrophosphat 65
3.11. Enzymkinetische Studien mit RNA-Polymerase I höherer Pflanzen 67
3.11.1. Einfluß der Substratkonzentration auf die Petersilien-RNA-Polymerase I 67
3.11.2. Einfluß der Substratkonzentration auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I 69
3.11.3. Nähere Betrachtung des sigmoiden Verhaltens der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen 72
3.11.3.1. Einfluß von CTP und ATP auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I 75
3.11.3.2. Komplexbildung zwischen Nucleosidtriphosphat und divalentem Kation 76
3.11.3.3. Einfluß von Nucleosiddiphosphat und Orthophosphat anstelle von NTP_{exc} auf die RNA-Polymerase I-Aktivität höherer Pflanzen 79
3.11.4. Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne 8o
3.12. Einfluß der Substratkonzentration auf die E.coli-RNA-Polymerase 83

4. Diskussion 88
4.1. DNA-abhängige RNA-Polymerase I höherer Pflanzen 89
4.1.1. Einfluß von Pflanzenhormonen 92
4.1.2. Einfluß der Substratkonzentration 93
4.2. Petersilie-Zellkerne 94
4.2.1. Transportstudien mit isolierten Petersilie-Zellkernen 96

4.3. Interaktion von NTP und divalenten Kationen bei der Transkription- und NTPase-Reaktion 97
4.4. Enzymkinetische Studien an RNA-Polymerasen 101
4.5. Enzymkinetische Studien mit der NTPase isolierter Petersilie-Zellkerne 104
5. Zusammenfassung 105
6. Literaturverzeichnis 108

1. Einleitung

Die genetische Information eines Organismus ist in Form von DNA mit für den jeweiligen Organismus spezifischen Basensequenzen niedergelegt. Um sie zu nutzen, muß sie nach dem von Crick aufgestellten " zentralen Dogma der Molekularbiologie " zunächst komplett oder in Teilen abgerufen und von der DNA in RNA überschrieben werden. Dieser Prozeß wird als Transkription bezeichnet und ist letztlich die entscheidende Voraussetzung für die Proteinsynthese (Translation). Er wird durch ein Enzym, eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, katalysiert. Der Transkriptionsprozeß ist einer der entscheidenden Kontrollmechanismen der Genexpression. Er unterliegt Regulations- und Modulationsvorgängen und besteht aus einer Anzahl hochspezifischer Teilschritte. Zu unterscheiden wäre zum einen zwischen dem enzymatischen Prozeß, der die Übertragung einer bestimmten Nucleotidsequenz auf der DNA in RNA gewährleistet und zum anderen den Erkennungsvorgängen, die dafür sorgen, daß die RNA-Polymerasen die spezifischen Start- und Stopsignale auf der DNA-Matrize finden. Hierdurch wird eine Selektivität der Transkription gewährleistet. Die wesentlichen Schritte der DNA-abhängigen RNA-Synthese sind folgende: 1. Bindung der RNA-Polymerase an eine spezifische Erkennungsregion der DNA, dem Promotor. Er bindet die Polymerase mit hoher Affinität und determiniert die Richtung der RNA-Synthese, sowie mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die erste Base, die von DNA in RNA überschrieben wird. 2. Aktivierung der RNA-Polymerase durch Purintriphosphat und Ausbildung der ersten Phosphodiesterbindung in Anwesenheit von Nucleosidtriphosphaten und Mg^{2+} - Ionen (Initation der RNA-Synthese). Fehlen die Nucleotide zerfällt der Polymerase-Promotorkomplex wieder. 3. Ablesung des codogenen Stranges der DNA in 3' - 5' - Richtung und Polymerisation der RNA unter Bildung eines DNA-RNA-Hybrids (Elongation). In vivo kann eine Elongationsgeschwindigkeit von 40-50 Nucleotiden pro Sekunde erreicht werden, während in vitro-Sys-

teme auf Werte von 15-4o Nucleotide pro Sekunde kommen. Bei geringen Substratkonzentrationen erfolgt Kettenwachstum in diskreten Schritten mit Verzögerungen an ganz bestimmten Punkten des DNA-Moleküls. Die Nucleotidzusammensetzung beeinflußt damit maßgeblich die Geschwindigkeit einer Kettenelongation. 4. Termination der Transkription über Bindung eines Proteinfaktors und spezifischer Erkennungsregion auf der DNA. Loslösung des Produkts bestehend aus RNA und RNA-Polymerase von der DNA und Regeneration der Polymerase.

Die mit der Evolution verbundene Zunahme der erforderlichen Informationsmenge pro Zelle, hat nach den Prokaryonten zur Ausbildung neuer Strukturprinzipien geführt. Der wohl grundlegenste Unterschied der Eukaryonten gegenüber den Prokaryonten besteht in der strengen Kompartimentierung zwischen Zellkern und Cytoplasma und der damit verbundenen räumlichen Trennung von Transkription und Translation. Der überwiegende Teil der DNA bei Eukaryonten findet sich im Kern der Zelle als Bestandteil des Chromatins. Während in den Bakterien die DNA "nackt" ist, liegt sie im Chromatin mit Proteinen assoziiert vor, die der Gruppe der basischen Histone und der sauren Nichthistonproteine angehören. Die Histone sind maßgeblich durch die Bildung der Nucleosomen- und Superbeadstruktur am Aufbau des Chromatins beteiligt (Georgiev et al. 1978). Zu den Nichthistonen hingegen gehören Enzyme, vermutlich ebenfalls Strukturproteine und eine Vielzahl regulatorischer Proteine. Betrachtet man die letzten fünf Jahre der Forschung auf diesem Gebiet, so wird immer wahrscheinlicher, daß die Nichthistone die Genexpression regulieren. Dies kann sowohl eine allgemeine, als auch eine spezifische Kontrolle der Transkription bestimmter Gene bedeuten (Stein et al. 1975). Änderungen in der Anzahl, Zusammensetzung, Wirkung und Abbau der Nichthistone über den Zellzyklus oder anderen Entwicklungsprozessen hin betrachtet, sind in Übereinstimmung mit einer regulatorischen Funktion dieser Makromoleküle. Im Laufe der Evolution kristallisierten sich bei den Eukaryon-

ten noch weitere Möglichkeiten zur Regulation des genabhängigen Stoffwechsels heraus. Anzuführen sind unter anderem die multiplen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen mit ihren unterschiedlichen Eigenschaften und Syntheseaufgaben, die Regulation auf der Ebene der Reifungsprozesse von Vorstufenmolekülen zu ribosomaler, messenger und transfer RNA und letztlich die kontrollierte Verlagerung der Ribonucleoprotein - Partikel durch die Kernhülle, die im Wechselspiel Zellkern - Cytoplasma eine besondere Rolle spielt. Der Transport informationaler RNA kann dabei in folgende Abschnitte unterteilt werden: 1. die Ablösung der neusynthetisierten RNA vom Chromatin und Verpackung mit spezifischen Proteinen, 2. den Transport zur Kernmembran, 3. den Transport der prozessierten RNA durch die Kernmembran ins Cytoplasma. Zur Erforschung dieser Transportvorgänge und des Transkriptionsprozesses werden heute immer mehr in vitro Systeme herangezogen, die Untersuchungen unter einfachen und standardisierten Bedingungen erlauben.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe von in vitro-Systemen, wie isolierten Kernen, Chromatin und RNA-Polymerase I, aus Zellen einer sehr homogenen Suspensionskultur von Petroselinum crispum, Aussagen über Transkriptions- und Transportvorgängen zu machen und sie unter dem Gesichtspunkt der Regulation in Funktionsmodelle zu fassen.
Rapaport et al. (1979) und Hershey (1979) konnten bei in vitro-Versuchen mit tierischen Zellkernen zeigen, daß ADP- und ATP-"Pools" im Kern für eine Regulation der DNA-Replikation verantwortlich zu sein scheinen. Diese vornehmlich die S-Phase betreffende Kontrolle sollte dabei in Zusammenhang mit dem Anstieg der Aktivität einer DNA abhängigen ATPase während des Zellzyclus gesehen werden. Volloch et al. (1979) wiesen in einem Präparat der Escherichia coli RNA-Polymerase eine NTPase-Aktivität nach. Ein Vergleich der Transkriptionsprodukte mit einem Präparat, das diese NTPase-Aktivität nicht enthielt, führte zu der Schlußfolgerung,

daß die NTPase in Verbindung mit der RNA-Polymerase steht und die Aufgabe hat, über eine Kontrolle des NTP-Pools, Fehler bei der Transkription zu vermeiden. Schon Siebert (1968) hielt es für möglich, daß die in isolierten tierischen Zellkernen vorkommende NTPase-Aktivität die Vorstufen-"Pools" der Nucleinsäuresynthese kontrollieren könnte. Schließlich konnten Grummt und Grummt (1976) den Beweis erbringen, daß in Maus Ehrlich Aszites Zellen Schwankungen in der Poolgröße der Purinnucleotide einen direkten Einfluß auf die RNA-Polymerase I haben und auf diese Weise die Syntheserate der rRNA bestimmen.
Bei Pflanzenzellen ist bisher was den Vorgang der Transkription und seine Regulierung angeht weit weniger bekannt als bei Zellen tierischen Ursprungs. Es gibt Hinweise, besonders im Fall der Hormonwirkung bei Pflanzen, daß neben der Möglichkeit der Modifikation und damit der Verfügbarkeit der DNA-Matrize auch Änderungen in der Enzymkonzentration und der RNA-Polymerase Aktivität als Regulationsprinzipien bei der Transkription in Frage kommen. In Erwägung gezogen wurde bisher jedoch noch nicht, ob vielleicht eine Regulation der RNA-Polymerasen im Zellkern nicht auch vom Substratangebot her und damit von der Nucleosidtriphosphatkonzentration (NTP) in Beziehung mit divalenten Kationen vorstellbar sei. Aus diesem Grunde soll im Rahmen dieser Arbeit dem Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die in vitro-Transkription isolierter Petersilie-Zellkerne und gereinigter RNA-Polymerase I besonderes Gewicht beigemessen werden. Die Ergebnisse dieser in vitro-Transkriptionsstudien werden mit einer in isolierten Petersilie-Zellkernen nachgewiesenen sehr hohen NTPase-Aktivität in Beziehung gebracht. Phosphatasen im Zellkern, speziell die NTPase, sind in der Lage durch hydrolytische Spaltung die Konzentration der NTP und damit der Vorstufenmoleküle der Transkription herabzusetzen und als Produkte NDP und anorganisches Phosphat freizusetzen. Das bedeutet, daß zum einen über die Kontrolle des NTP-Pools

im Zellkern durch die NTPase eine Regulation des Transkriptionsprozesses auf Enzymebene möglich werden kann, zum anderen aber auch durch die Zunahme des Orthophosphats im Zellkern eine Beeinflussung der Chromatinstruktur in Erwägung gezogen werden muß.
Ein weiterer Gesichtspunkt, der weder bei Prokaryonten noch bei Eukaryonten bisher in ausreichender Weise beleuchtet wurde, ist das enzymkinetische Verhalten der RNA-Polymerasen. Es werden deshalb enzymkinetische Studien mit RNA-Polymerase I höherer Pflanzen vorgestellt und mögliche Unterschiede zur Escherichia coli RNA-Polymerase diskutiert.
Neben der Transkription kommt bei den Eukaryonten dem Transport neusynthetisierter RNA ins Cytoplasma besondere Bedeutung zu, da er eine weitere Regulationsmöglichkeit im Stoffwechsel der Zelle darstellt. Bei einer Reihe von Zellkernen aus tierischen Organismen wurde übereinstimmend festgestellt, daß ATP die Freisetzung von RNA-Molekülen aus den Kernen fördert, divalente Kationen dagegen diesen Vorgang hemmen. Es wurde aufgezeigt, daß der Eigenschaft des ATP Chelatkomplexe mit divalenten Kationen einzugehen, die Funktion als Überträger der chemischen Energie gegenüberzustellen ist. Mit Hilfe eines neuentwickelten Filtrationsverfahrens, das es erlaubt, die Transkription und die RNA-Freisetzung bei isolierten Petersilie-Zellkernen gleichzeitig studieren zu können, soll eine Möglichkeit aufgezeigt werden, den RNA-Transport in Abhängigkeit von NTP und divalenten Kationen bei höheren Pflanzen zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellmaterial und Kulturbedingungen

Wurzelkalluszellen von Petroselinum crispum (Mill.) A.W.Hill wurden in Belüftungsröhren (Großmann 1978), Schüttelkulturen oder Fermenter (Microferm, New Brunswick) angezogen. Die Zellen wuchsen unter sterilen Bedingungen in einem vollsynthetischen Nährmedium (Seitz und Richter 1970) bei 26°C im Dauerdunkel heran. Für die Kern-, Chromatin- und Polymeraseisolierung wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet.

2.2. Präparation und Reinigung der Zellkerne

Die Isolierung erfolgte nach einem früher beschriebenen Verfahren (Großmann et al. 1979a). Dabei wurden 50g Petersiliezellen im Isolierungsmedium 1 (IM 1), das 2 % Pektinase und 1,5 % Cellulase enthielt, bei 30°C für 4 h inkubiert. Die erhaltenen Rohprotoplasten wurden mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator aufgeschlossen. Nach Filtration durch Nylonnetze wurden die Rohkerne abzentrifugiert, in IM 2 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Kernsediment wurde in IM 1 suspendiert, auf ein Saccharosekissen (23 ml IM 3 mit 1,2 M Saccharose) aufgegeben und bei 20 000 Upm für 7 min bei 2°C in einem Beckman Rotor (SW 25.1) zentrifugiert. Das Kernsediment wurde in IM 3 mit 1,0 M Saccharose resuspendiert und über einen diskontinuierlichen Gradienten mit den Stufen 1,2 / 1,4 / 1,8 M Saccharose für 10 min bei 4000 Upm im SW 25.1 Rotor zentrifugiert. Die gereinigten Kerne wurden der Zone mit 1,2 und 1,4 M Saccharose entnommen und konnten in IM 1 mit 40 % (v/v) Glycerin bei -20°C für 8 Tage ohne Verlust ihrer biologischen Aktivität gelagert werden. Für in vitro-Versuche wurden sie abzentrifugiert und in IM 1 resuspendiert.

2.3. Präparation und Reinigung von Chromatin

Die Isolierung von Chromatin erfolgte nach der Methode von Huang und Bonner (1962) modifiziert nach Guilfoyle und Hanson (1973). 1oog eingefrorene Petersiliezellen wurden in 16o ml Homogenisationspuffer (2.5.3.1.) suspendiert und mit einem Ultra Turrax (Janke und Kunkel) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch Mullgewebe und Miracloth (Calbiochem) filtriert, im Sorvall SS 34-Rotor bei 58oo Upm für 3o min zentrifugiert und das Sediment in Homogenisationspuffer suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 9ooo Upm für 3o min wurde das Sediment zweimal mit Saccharosemedium (2.16.) und zweimal mit Tris-Puffer pH 8,o durch sukzessive Zentrifugationen gewaschen und das erhaltene Rohchromatin auf ein 1,8 M Saccharosekissen aufgetragen. Die Zentrifugation fand in einem Beckman SW 25.1 Rotor bei 24 ooo Upm für 3 h statt. Das Sediment wurde in 2o ml 1 % Triton-Lösung suspendiert und in einem Sorvall SS 34-Rotor bei 12 ooo Upm für 3o min zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Tris-Puffer pH 8,o gewaschen und das gereinigte Chromatinsediment in Tris-Glycerin-Puffer pH 8,o suspendiert und bei -6o°C aufbewahrt.

2.4. DNA - Isolierung (nach Hemleben et al. 1975)

2og Petersiliewurzeln wurden mit 1oo ml Tris-EDTA-SDS-Puffer pH 7,5 versetzt und mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einem gleich großen Volumen Phenolmix 2o min lang geschüttelt, 1o min in einer Heraeus-Christ-Minifuge bei 5ooo Upm zentrifugiert und die wässrige Phase abgehoben. Die Phenolphase wurde einmal mit je einem halben Volumen Tris-EDTA-Puffer, die vereinigten wässrigen Phasen mit einem halben Volumen Phenolmix nachextrahiert. Die letzte Phenolphase wurde nochmals mit einem halben Volumen Tris-EDTA-SDS-Puffer nachextrahiert. Die Nucleinsäuren in den vereinigten wässrigen Phasen wurden mit dem doppelten Volumen 96 % Äthanol über Nacht (-2o°C) ausgefällt. Die präzipitier-

ten Nucleinsäuren wurden abzentrifugiert, mit 7o % Äthanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Nach dem Lösen in Tris-EDTA-Puffer wurden die Nucleinsäuren mit Ribonuclease A (5oo µg/ml Lösung) für 2 h bei 37°C behandelt, mit einem Volumen Phenolmix: Chloroform (1:1) geschüttelt und sowohl die Phenolphase mit einem halben Volumen Tris-EDTA-Puffer als auch die vereinigten wässrigen Phasen mit einem halben Volumen Phenolmix-Chloroform nachextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden auf 4°C abgekühlt und die DNA mit 2 Volumina 96 % Äthanol ausgefällt.

2.5. Isolierung und Reinigung von RNA-Polymerase I aus Petersilie-Suspensionszellen

2.5.1. Vorbereitung der Ionenaustauscher

5o g DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman) wurde über Nacht in o,5 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer äquilibriert, in eine Pharmacia-Chromatographie-Säule (K 15/3o; 1,5x3o cm) gegossen und mit o,o5 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer gewaschen. 1ogDEAE-Cellulose wurden für "Batch-Bedingungen" über Nacht in o,25 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer äquilibriert. 5og Phosphocellulose (P 11, Whatman) wurden 1o min in o,o1 N KOH unter Rühren äquilibriert, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, mit o,o1 N HCl 1o min äquilibriert und nochmals dreimal mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter KOH auf 7,4 (25°C) eingestellt und die Phosphocellulose über Nacht in o,5 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer inkubiert und anschließend für 6 - 8 h in o,1 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer äquilibriert.

2.5.2. Bestimmung des Brechungsindexes und des Proteingehalts

Die Ammoniumsulfatkonzentration wurde mit einem Zeiss Refraktometer bestimmt. Der Proteingehalt wurde nach der von Lowry et al. (1951) beschriebenen Methode bestimmt.

2.5.3. Isolierung der RNA-Polymerase I aus Chromatin

Das Enzym wurde nach Guilfoyle et al. (1976) und modifiziert nach Großmann et al. (1980) isoliert.

2.5.3.1. Chromatinpräparation

2 kg gefrorene Petersiliezellen wurden in 3 l Homogenisationspuffer suspendiert und mit einem Ultra Turrax aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch Mullgewebe filtriert, mit Triton-X-100 (40 ml/l Homogenat) versetzt, 10 min gerührt und durch Miracloth filtriert. Die gereinigte Lösung wurde bei 13000 g für 30 min zentrifugiert, das Sediment in Homogenisationspuffer suspendiert und erneut für 30 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in wenig Homogenisationspuffer aufgenommen, mit einem Ultra Turrax durchmischt und für 30 min bei 13 000 g zentrifugiert. Das Sediment (gereinigtes Chromatin) wurde in 30 ml TEDG-Puffer suspendiert, mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 50 % (v/v) gebracht und bei -60°C aufbewahrt.

2.5.3.2. "Batch" - Verfahren

Das Chromatin wurde bei -4°C aufgetaut und unter langsamer Zugabe von festem $(NH_4)_2SO_4$ (Endkonzentration 0,5 M) für 2 h gerührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 180 000 g für 45 min in einem Beckman 60 Ti Rotor entfernt und dem vereinigten Überstand ein gleich großes Volumen TED-Puffer und 20 ml in 0,25 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer äquilibrierter DEAE-Cellulose unter Rühren zugesetzt. Danach wurde für 10 min bei 1800 g zentrifugiert und dem erhaltenen Überstand ein gleich großes Volumen TEDG-Puffer und 35 ml in 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer äquilibrierter Phosphocellulose unter Rühren zugefügt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das "Batch-Sediment" in 15 ml 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer suspendiert und auf eine Säule (Pharmacia; 1,5 x 30 cm) mit in 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer äquilibrierter Phosphocellulose aufgeschichtet.

2.5.3.3. Phosphocellulose - Chromatographie (PC 1)

Die Säule wurde mit 1oo ml o,1 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit 2oo ml o,3 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 2,5 ml Fraktionen gesammelt und auf Enzymaktivität und Proteingehalt getestet. Die aktiven Fraktionen (1o - 17) wurden vereinigt und mit TEDG-Puffer auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von o,o5 M verdünnt.

2.5.3.4. DEAE - Cellulose - Chromatographie (DE)

Die Probe wurde dann auf die mit o,o5 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer voräquilibrierte DEAE-Säule aufgetragen und mit 1oo ml desselben Puffers nachgewaschen. Mit einem linearen Gradienten von o,o5 - o,5 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer wurde eluiert und die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Diejenigen Fraktionen, die α-Amanitin-resistente RNA-Polymerase-Aktivität aufwiesen (9 - 17), wurden vereinigt und mit TEDG-Puffer über die Messung des Brechungsindexes auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von o,1 - o,12 M eingestellt.

2.5.3.5. Phosphocellulose - Chromatographie (PC 2)

Die Probe wurde auf eine weitere Phosphocellulose-Säule (1,5 x 2o cm) aufgetragen und die Säule mit 1oo ml o,1 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit o,3 M $(NH_4)_2SO_4$-TEDG-Puffer eluiert und die Fraktionen in 1,7 ml Portionen gesammelt und auf RNA-Polymerase-Aktivität überprüft. Die Fraktionen 1o - 16 wurden vereinigt, mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 5o % (v/v) eingestellt und bei -6o°C aufbewahrt.

2.5.3.6. Saccharosedichtegradienten - Zentrifugation

Ein Aliquot (1,5 ml) der aktiven PC 2-Fraktionen wurde auf einen linearen Saccharosegradienten (5 - 2o %) aufgeschichtet und für 6o h bei 37 ooo Upm in einem Beckman SW 4o Ti-Rotor zentrifugiert. Fraktionen von o,2 ml wurden gesammelt und auf Polymeraseaktivität untersucht.

2.5.4. Polyacrylamidgel - Elektrophorese

Die diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli (1970) bereitet. Das "Slab"-Gel enthielt ein Sammelgel von 2,4 % Acrylamid und ein Trenngel, dessen obere Hälfte 5 % und unten 10 % Acrylamid aufwies. Gereinigte RNA-Polymerase I nach der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation wurde unter denaturierenden Bedingungen bei 120 V für 3,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden die Proben nach Schwartz und Roeder (1974) 5:1 mit Probenpuffer versetzt und bei 80°C für 5 min erwärmt. Als Vergleich für die Molekulargewichtsbestimmung dienten käufliche Proteine (Bio Rad) im Bereich von 30 000 - 200 000 D. Die "Slab"-Gele wurden nach Maizel (1969) angefärbt.

2.6. Isolierung und Reinigung von RNA-Polymerase I aus Sojabohne

Das Enzym wurde freundlicherweise von H. Friedrich (Lehrstuhl für Genetik, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Es wurde aus 2,4 D-behandelten Hypokotylen der Sojabohne isoliert und über Agarose A-1,5 m Gelfiltration, Heparin-Sepharose- und DEAE-Cellulose-Chromatographie gereinigt.

2.7. RNA-Polymerase aus Escherichia coli MRE 600

E. coli RNA-Polymerase wurde von der Fa. Boehringer, Mannheim käuflich erworben.

2.8. In vitro-Transkription mit isolierten Zellkernen der Petersilie

2.8.1. Inkubationsbedingungen

Das vollständige Inkubationsmedium abgeändert nach Hamilton et al. (1972) enthielt 20 mM Tris. HCl (pH 7,8), 200 mM Saccharose, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 1 mM $MnCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1,25 % Ficoll, 2,5 % Dextran T40, 1 mM je ATP, GTP, CTP, UTP, 0,3 µCi [5-^{3}H] UTP und 0,25 ml Kernsuspension in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml. Die Transkriptionsreaktion wurde mit Zugabe der Kernsuspension ge-

startet (o,8 x $1o^6$ Kerne pro Ansatz) und fand bei 36^oC statt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von o,1 mg Rinderserumalbumin in o,5 ml kalter o,1 M Natriumpyrophosphatlösung unterbunden. Die Kernfraktion wurde auf Millipore Filter (RA 1,2 um, Ø 25 mm) gesammelt (I). Die Filterscheiben mit den abfiltrierten Zellkernen wurden auf ein Reihenfiltrationsgerät übertragen und mit 2o % TCA (in o,o1 M $Na_4P_2O_7$) behandelt. Zu den im Schritt (I) erhaltenen Filtraten wurden 3o % TCA (in o,o1 M $Na_4P_2O_7$) hinzugefügt und das TCA unlösliche Material ebenfalls auf Filtern gesammelt. Anschliessend wurden sowohl die Filter mit ausgefällter "Kern"-RNA, als auch die mit ausgefällter "Filtrat"-RNA viermal mit 2 % TCA und einmal mit 96 % Äthanol gewaschen. Die Filter wurden getrocknet ($6o^oC$) und die Radioaktivität im Toluol-PPO-POPOP Scintillator bestimmt.

2.8.2. Aufarbeitung der in vitro - Transkriptionsprodukte

Für die Aufarbeitung der in vitro-Transkriptionsprodukte wurde der Transkriptionsansatz auf ein Volumen von 1o ml erweitert ($1o^8$ Kerne) und für 3o min bei 36^oC inkubiert. Danach wurden die Kerne abzentrifugiert und die RNA nach Cox und Turnock (1973) extrahiert. Nach dem Ausfällen der RNA wurde abzentrifugiert, das Präzipitat getrocknet und in 1oo µl Loening-Puffer (1x) aufgenommen. Als RNA-Standard diente rRNA von E.coli.

2.9. In vitro - Transkription mit Petersilie-RNA-Polymerase I

2.9.1. Standard - Inkubationsbedingungen

Das Verfahren beschrieben von Guilfoyle et al. (1975) wurde in abgeänderter Form angewandt. Der Inkubationsansatz enthielt, wenn nicht anders angegeben, in einem Endvolumen von 5oo µl o,o5 M Tris.HCl (pH 8,o), 25 % Glycerin (v/v), o,oo1 M $MnCl_2$, o,oo6 M $MgCl_2$, o,o2 M $(NH_4)_2SO_4$, 1oo µg/ml hitzedenaturierte Lachssperma-DNA, o,o2 M DTT, o,4 mM ATP, CTP und GTP, o,o4 mM [5'-^{3}H] UTP (o,5 µCi bei Isolierung, 4 µCi bei Charakterisierung des Enzyms) und 2o µl Enzymlösung (Protein-

gehalt 9,4 µg). Der Ansatz wurde bei 29°C für 3o min inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 4 ml 5 % TCA beendet und die Teströhrchen für 1o min in Eis belassen. Das TCA unlösliche Material wurde auf Whatman GF/C Filterscheiben gesammelt, sechsmal mit 5 % TCA und zweimal mit 2 ml 96 % Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität wurde in einem Toluol-PPO-POPOP Scintillator bestimmt.

2.9.2. Aufarbeitung der in vitro - Transkriptionsprodukte

Für die Aufarbeitung der in vitro-Transkriptionsprodukte wurde der Ansatz auf ein Volumen von 1 ml erweitert. In Abänderung von 2.9.1. enthielt das Reaktionsgemisch 3o µg/ml hitzedenaturierte Wurzel-DNA der Petersilie oder Lachssperma-DNA, 28 µCi [5'-^{3}H] UTP und 6o µl Enzymlösung. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz o,5 ml Tris-EDTA-Puffer und 1,5 ml Phenolmix gegeben, 2 min geschüttelt und für 15 min bei 5ooo Upm in einer Heraeus Christ Minifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA mit zwei Volumina 96 % Äthanol bei -18°C über Nacht ausgefällt. Danach wurde zentrifugiert, der Äthanolüberstand verworfen und das Präzipitat bei Zimmertemperatur getrocknet und anschliessend in 1oo µl Loening-Puffer (1x) aufgenommen. Als Standard diente rRNA von E.coli.

2.1o. In vitro - Transkription mit Sojabohnen-RNA-Polymerase I

2.1o.1. Standard - Inkubationsbedingungen

Die Bedingungen wurden abgeändert nach Guilfoyle et al. (1976) wie folgt gewählt. Der Inkubationsansatz enthielt, wenn nicht anders angegeben, in einem Endvolumen von 5oo µl o,o5 M Tris. HCl (pH 8,o), 25 % Glycerin (v/v), o,oo6 M $MgCl_2$, o,o5 M $(NH_4)_2SO_4$, 1oo µg/ml hitzedenaturierte Lachssperma-DNA, o,4 mM ATP, CTP und GTP, o,o4 mM [5'-^{3}H] UTP (4 µCi), o,o2 M DTT und 2o µl Enzymlösung (Proteingehalt 9 µg). Die Inkubation und Aufarbeitung wurde schon in 2.9.1. beschrieben.

2.11. In vitro - Transkription mit E.coli-RNA-Polymerase

2.11.1. Standard - Inkubationsbedingungen

Das Inkubationsmedium abgeändert nach Burgess (1971) enthielt, wenn nicht anders angegeben, in einem Endvolumen von 5oo µl o,o4 M Tris.HCl (pH 7,9), 25 % Glycerin (v/v), o,oo8 M $MgCl_2$, o,o75 M KCl, 1oo µg/ml hitzedenaturierte Lachssperma-DNA, o,4 mM ATP, CTP und GTP, o,o4 mM [5'-^{3}H] UTP (4 µCi), o,ooo1 M DTT und 1o µl Enzymlösung (o,5 units). Das käufliche Enzym wurde 1:25 mit einem Puffer verdünnt, der o,o1 M Tris.HCl (pH 8,o), o,1 M KCl, o,ooo5 M DTT und 25 % Glycerin enthielt. Die Inkubation wurde für 3o min bei 33°C durchgeführt und der Reaktionsansatz nach 2.9.1. weiterbehandelt. 1 Enzymeinheit (unit) ist die Enzymaktivität, die unter den Testbedingungen in 1o min den Einbau von 1 nMol AMP als säurefällbare Fraktion bewirkt.

2.12. Auftrennung der in vitro-synthetisierten RNA mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der in 2.8.2. und 2.9.2. erhaltenen in vitro-Transkriptionsprodukte erfolgte nach dem von Loening (1969) beschriebenen Verfahren mit Rundgelen, die eine Acrylamidkonzentration von 2,1 % aufwiesen. Nach einer Vorelektrophorese von 3o min Dauer (Elektrophoreseapparatur, Shandon, England) wurde die Trennung der aufgeschichteten Nucleinsäurelösung bei 4°C und einer Laufzeit von 2 h bei 2,5 mA/Gel durchgeführt. Nach einer Fixierzeit von 2o min in 1 M Essigsäure wurde die UV-Absorption bei 265 nm gemessen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Gele mit CO_2-Schnee eingefroren, mit einem Gelschneider (Mickle Laboratories, Camberley, England) in Scheibchen von 1 mm geschnitten und direkt in Scintillationsgläschen gelegt. Sie wurden mit o,5 ml Ammoniak (12,5 %) versetzt und ihre Radioaktivität am folgenden Tag unter Zugabe von 3,5 ml Unisolve bestimmt.

2.13. Affinitätschromatographie von Sojabohnen-RNA-Polymerase I an Plasmid-DNA mit Sojabohnen-rRNA-Genen als "Insert"

2.13.1. Kopplung von Plasmid-DNA an CNBr-aktivierter Sepharose

Die Kopplungsreaktion wurde nach Vorschrift (Pharmacia, Affinity Chromatography) und Arndt-Jovin et al. (1975) durchgeführt. 1g CNBr-aktivierte Sepharose-4B (Pharmacia Fine Chemicals) wurde für 15 min in 1 mM HCl gequollen. Anschließend wurde mehrmals mit 1 mM HCl, Aqua dest. und einmal mit 1o mM K_3PO_4 (pH 8,2) gewaschen. Die so vorbehandelte CNBr-aktivierte Sepharose wurde zu 1 mg Plasmid-DNA (PBR 322 supercoil mit Insert, das die rRNA-Cistrons der Sojabohne enthielt) in 5 ml 1o mM K_3PO_4-Puffer gegeben und bei Zimmertemperatur über Nacht sehr vorsichtig gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1o ml 1 M Ammoniumacetat (pH 7,o) beendet und die DNA-Sepharose nach 2 h in eine kleine Säule eingefüllt.

2.13.2. Affinitätschromatographie

Die Säule wurde bei Zimmertemperatur mit 1o ml Polymerase-Bindepuffer äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml Sojabohnen-RNA-Polymerase I (gereinigt über Agarose-Gelfiltration, siehe 2.6.) aufgetragen. Der Durchlauf wurde nochmals auf die Säule geschichtet und die Säule mit TMM-Puffer gewaschen. Danach wurde mit einem linearen Salzgradienten von o,o5 - 1 M KCl in TMM-Puffer eluiert und die Fraktionen einem Enzymaktivitätstest unterzogen.

2.14. Darstellung der RNA-Polymerase I an DNA im Elektronenmikroskop

Isolierte Petersilien-RNA-Polymerase I wurde nach 2.9.1. in vitro inkubiert und ein Aliquot nach einem von Koller et al. (1974) beschriebenen Verfahren gespreitet. Dabei wurden 3 µl des Inkubationsansatzes (6 µg/ml Lachssperma-DNA) auf ein Tröpfchen von 2o µl Ethidiumbromid (14o µg/ml, 3o mM Tricine,

pH 9, 1 mM EDTA) aufgegeben und durchmischt. Nach 1o min wurde die Oberfläche mit einem befilmten Kupfernetzchen leicht angetippt. Anschließend wurde in 9o % Äthanol dehydriert und kegelbedampft. Die fertigen Netzchen wurden im Zeiss M9 Elektronenmikroskop betrachtet und photographiert.

2.15. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität der isolierten Petersilie-Zellkerne

Die Phosphatase-Aktivität der Kerne wurde gemäß Lin und Morales (1977) an Hand des bei der Reaktion freigesetzten anorganischen Phosphats (P_i) bestimmt. Dabei wurden o,96 ml 5o mM Tris.HCl Puffer (pH 7,8) in ein Reagenzglas pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2o µl Substratlösung (wie angegeben) und 2o µl Kernsuspension ($1x1o^5$ Kerne) gestartet und für 1o min bei 36^oC inkubiert. Die Reaktion wurde nach 1o min durch Zugabe von 1 ml Molybdovanadat-Reagenz beendet. Nach 3 min wurde bei 366 nm in einem Eppendorf Spektrophotometer die Absorption des Farbkomplexes bestimmt, der aus dem freigesetzten Orthophosphat und Molybdovanadat gebildet wurde. Mit Hilfe einer Eichkurve unterschiedlicher Na_2HPO_4-Konzentrationen und unter Abzug des Leerwerts (Ansatz ohne Kerne) konnte die freigesetzte Orthophosphatmenge bestimmt werden.

2.16. Puffer und Lösungen

IM 1
2o mM Tris.HCl (pH 7,8), 2oo mM Saccharose, 2 mM $CaCl_2$, 1o mM 2-Mercaptoäthanol, 5 mM $MgCl_2$, 1o mM KCl, 2,5 % Ficoll (w/v) und 5 % Dextran T4o (w/v)

IM 2
IM 1 mit o,o2 % Triton-X-1oo

IM 3
IM 1 ohne 2oo mM Saccharose

Homogenisationspuffer
o,o5 M Tris.HCl (pH 8,o), o,25 M Saccharose, o,oo1 M $MgCl_2$, o,7 % 2-Mercaptoäthanol

Saccharose - Medium
o,25 M Saccharose, 1o mM Mercaptoäthanol

Tris - Puffer
5o mM Tris.HCl (pH 8,o), 1o mM Mercaptoäthanol

Triton - Lösung
1 % Triton-X-1oo in Tris-Puffer

Tris - Glycerin - Puffer
25 mM Tris.HCl (pH 8,o), 1o mM Mercaptoäthanol, 5o % Glycerin

Tris - EDTA - Puffer
o,1 M Tris.HCl (pH 7,5), o,o1 M EDTA

Tris - EDTA - SDS - Puffer
Tris-EDTA-Puffer mit 1 % SDS

Phenolmix
In 4oo ml : 25og Phenol, 75 ml Aqua bidest., 35 ml Kresol, 25o mg Hydroxychinolin

TED - Puffer
o,o5 M Tris.HCl (pH 8,o), o,oo1 M EDTA, o,oo1 M DTT

TEDG - Puffer
TED-Puffer mit 3o % Glycerin

Saccharosegradient (5 - 2o %)
Saccharose (w/v), o,25 M Ammoniumsulfat, o,oo1 M $MgCl_2$, o,o5 M Tris.Hcl (pH 8,o), o,1 mM EDTA, o,o1 M DTT, 3o % Glycerin

Toluol - PPO - POPOP - Scintillator
4g PPO, o,1g POPOP auf 1 l Toluol

Elektrophorese - Probenpuffer (1x)
2,5 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 1 % SDS, o,5 mM DTT, 2o % Glycerin, o,oo5 % Bromphenolblau

Loening - Puffer (1x)
3,6 mM Tris, 3 mM NaH_2PO_4, o,1 mM EDTA, o,o2 % SDS

Polymerase - Bindepuffer
1o mM Tris.HCl (pH 8,o), 5o mM KCl, 1o mM $MgCl_2$, o,1 mM EDTA, o,1 mM DTT, 25 % Glycerin

TMM - Puffer
6 mM Tris.HCl (pH 7,6), 6 mM $MgCl_2$, 6 mM Mercaptoäthanol

Molybdovanadat - Reagenz
a.) 1og $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ und 1 ml NH_3 wird mit Aqua bidest. auf 1oo ml aufgefüllt
b.) o,235g NH_4VO_3 in 4o ml heißem Aqua bidest. lösen und abkühlen lassen, o,61 ml HNO_3 hinzufügen und mit Aqua bidest. auf 1oo ml auffüllen
c.) 2og SDS in 1oo ml lösen
Reagenzlösung:
Lösungen a.), b.) und c.) vereinigen, 37 ml HNO_3 hinzufügen und mit Aqua bidest. auf 1ooo ml auffüllen.

2.17. Chemikalien und Abkürzungen

2.17.1. Chemikalien

Amersham Buchler, Braunschweig
Uridin-5-H3-5'-triphosphat, Ammoniumsalz

Bio Rad Laboratories, München
Eichproteine
Boehringer, Mannheim
ATP, ADP, AMP, AMPPCP, A-3:5-MP cycl., GTP, CTP, UTP, Poly d(A-T) , Ribonuclease A, RNA-Polymerase (E.coli MRE 6oo), α-Amanitin

Calbiochem (Päsel, Frankfurt)
Miracloth

Deutsche Saati KG, Mössingen
Nylonnetze

Kinki Yakult MFG Co. LTD, Nishinomiya, Japan
Onozuka R1o

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Dextran T4o, Ficoll 4oo, Sepharose 4B, CNBr-aktiviert

Schuchardt, München (Merck-Schuchardt)
Acrylamid, m-Kresol, N,N'-Methylenbisacrylamid

Serva, Heidelberg
Aminosalicylsäure, Ammoniumpersulfat, 2,4-D, 3,5-D, DMAPN, Lachssperma-DNA, Mercaptoäthanol, Pektinase, Rinderserumalbumin, SDS, TEMED, TNS, Triton-X-1oo

Sigma, München
α-Naphtylessigsäure, ß-Naphtylessigsäure

Whatman Ltd, Springfield Mill., England
DEAE-Cellulose (DE 52), GF/C-Filter, Phosphocellulose (P 11)

Zinsser, Frankfurt
Unisolve

2.17.2. Abkürzungen

ADP	5'-Adenosindiphosphat
AMP	5'-Adenosinmonophosphat
3',5'-cAMP	3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
AMPPCP	ß-γ-Methylen AMP
ATP	5'-Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
CDP	5'-Cytidindiphosphat
cpm	Impulse pro Minute
CTP	5'-Cytidintriphosphat
2,4 D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
3,5 D	3,5-Dichlorphenoxyessigsäure
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DMAPN	Dimethylaminopropionitril
DNA	Desoxyribonucleinsäure

DNP	Desoxyribonucleoprotein
DTT	1,4-Dithioerythrit
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
GA_3	Gibberellinsäure
GDP	5'-Guanosindiphosphat
GTP	5'-Guanosintriphosphat
HnRNA	heterogenous nuclear RNA
IES	Indolessigsäure-(3)
Kat_{exc}	Divalente Kationen über die äquimolaren Konzentrationen von divalenten Kationen und NTP im Inkubationsansatz
K_m	Michaelis-Menten Konstante
mRNA	messenger RNA
NaPP	Natriumpyrophosphat
NDP	5'-Nucleosiddiphosphat
NTP	5'-Nucleosidtriphosphat
NTPase	Nucleosidtriphosphatase
NTP_{exc}	NTP über die äquimolaren Konzentrationen von divalenten Kationen und NTP im Inkubationsansatz
P_i	anorganisches Phosphat (Orthophosphat)
pNP	p-Nitrophenylphosphat
POPOP	2,2'-Phenylenbis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
S	Sedimentations-Koeffizient (Svedberg)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TNS	Triisopropylnaphtalinsulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat

Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	5'-Uridintriphosphat
V	Enzymgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Enzymgeschwindigkeit

3. Ergebnisse

3.1. Petersilie - Suspensionskultur

Die Kulturen enthalten neben wenigen Einzelzellen vorwiegend Zellhäufchen. Auch bei den größeren Aggregaten ist der direkte Kontakt fast aller Zellen mit dem Kulturmedium gesichert. Der Kontakt der wachsenden Zellen untereinander wird durch Plasmodesmen aufrechterhalten. Eine Embryogenese, Zelldifferenzierung oder Chloroplastenentwicklung konnte nicht beobachtet werden (Spieß und Seitz 1975).

Abb.1: Zellen einer Suspensionskultur von Petroselinum crispum.

Betrachtet man das Wachstumsverhalten der Suspensionskultur in den Belüftungsröhren, so ergibt sich, daß die Zellen nach einer lag-Phase von 3 - 5 Tagen in die exponentielle Wachstumsphase übergehen und die stationäre Phase nach 1o - 14 Tagen erreichen (Seitz und Richter 197o, Großmann 1978). Dabei wird eine Verachtfachung des Zellausgangsmaterials erhalten. In Schüttel- und Fermenter-Kultur lagen die Zellzuwachsraten geringer.

3.2. Zellkernisolierung aus Petersilie-Suspensionszellen (Großmann et al. 1979a)

Eine Kernisolierung aus pflanzlichem Gewebe bringt sehr viel mehr technische Probleme mit sich, als die Isolierung von Kernen aus tierischen Objekten. Die Hauptschwierigkeiten, die Pflanzenzelle schnell und schonend aufschliessen zu können, sind zurückzuführen auf ihre stabile Zellulosewand. Die Anwesenheit von Chloroplasten, Plastiden und Stärkekörner stellen eine zusätzliche Schwierigkeit dar, da diese Zellbestandteile ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie die Kerne aufweisen und so zur Verschmutzung des Kernpräparates beitragen können. Durch die Wahl des Versuchsobjektes und durch die Vorbehandlung der Suspensionszellen mit zellwandabbauenden Enzymen konnten diese Schwierigkeiten zum größten Teil beseitigt werden. Die Daten für die Isolierung sind wie folgt anzugeben: Die Ausbeute an Zellkernen vor dem Reinigungsschritt (Rohkerne) belief sich auf 60 - 80 %, nach dem Reinigungsschritt ergab sich eine Ausbeute von 15 - 30 % der Ausgangszellzahl (Großmann 1978).

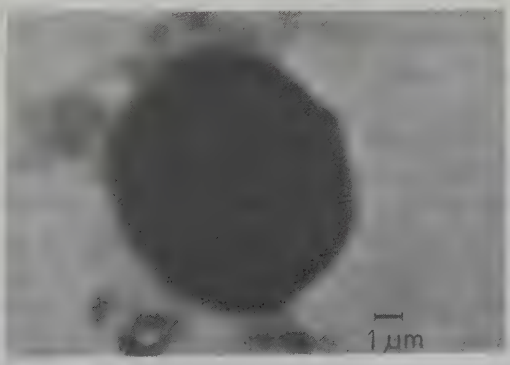

Abb.2: Isolierter Zellkern aus Petroselinum crispum nach Anfärben mit Karminessigsäure.

Als Kriterium für die Qualität der isolierten Zellkerne

ergab sich bei in vitro-Transkriptionsstudien, bei denen ein Einbau von 45 pMol UTP pro Minute und 10^6 Zellkerne in fällbare RNA gemessen werden konnte (Großmann 1978). Die Syntheserate liegt weit höher als die in der Literatur beschriebenen, mit isolierten Kernen verschiedener Pflanzenzellen erhaltenen Werte (Blaschek et al. 1974, Mennes et al. 1977). Eine elektrophoretische Untersuchung der in vitro-Transkriptionsprodukte ist in Abb.3 dargestellt.

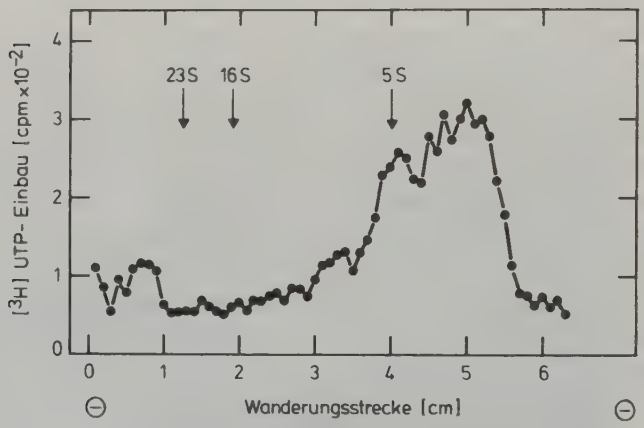

Abb.3: In vitro-Transkription mit isolierten Petersilie-Zellkernen. Die Zellkerne wurden nach 2.2. isoliert und nach 2.8.2. inkubiert und die Transkriptionsprodukte extrahiert. Die Auftrennung erfolgte auf 2,1 % SDS-Polyacrylamidgelen nach 2.12.

Der Hauptteil der synthetisierten und radioaktiv markierten RNA liegt im Bereich von 3 - 8 S. Ein weiterer Teil erscheint als abgesetzter Peak mit einem Molekulargewicht von ungefähr 31 S. Bei diesem hochmolekularen Transkriptionsprodukt dürfte es sich um eine Vorstufe der ribosomalen RNA handeln (Seitz und Seitz 1979), während die niedermolekularen

Syntheseprodukte nicht charakterisiert werden können. Wahrscheinlich stellen sie zum größten Teil Abbauprodukte hochmolekularer RNA dar, die durch eine endogene Ribonuclease-Aktivität entstanden sind (Slater et al. 1978).

3.3. Isolierung und Reinigung von RNA-Polymerase I aus Petersilie (Großmann et al. 1980)

Link und Richter (1975) zeigten, daß Petersilie-Suspensionszellen eine ideale Quelle für die Isolierung von RNA-Polymerase II darstellen. Bei ihrem Verfahren jedoch erwies es sich, daß die RNA-Polymerase I die Reinigungsprozedur nicht überlebt hatte. Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren ist es jedoch gelungen, die RNA-Polymerase I aus Petersilie-Suspensionszellen zu isolieren. Nach Lin et al. (1974) enthält Chromatin, isoliert bei einem pH-Wert von 8,0, den größten Teil der nucleolaren RNA-Polymerase I gebunden, während die RNA-Polymerase II im Überstand des Chromatinsediments erscheint. Das unter diesen Bedingungen isolierte Chromatin wurde mit 0,5 M Ammoniumsulfat behandelt, um die RNA-Polymerase I abzulösen. DEAE-Cellulose und Phosphocellulose in "Batch"-Verfahren sorgten für eine gute Reinigung der abgelösten RNA-Polymerase I. Die Reinigung zeigte sich bei der ersten Phosphocellulose-Chromatographie, bei der die Enzymaktivität zusammen mit dem Proteinpeak bei 0,12 M Ammoniumsulfat eluiert wurde und die für das Enzym eine 74-fache Reinigung bei einer Ausbeute von 94 % ergab (Abb.4; Tabelle 1). Würde man diese Daten nicht auf das Chromatin, sondern auf den Rohextrakt beziehen, ergäbe sich für den Reinheitsgrad einen weit höheren Wert. Von der nachfolgenden DEAE-Cellulose-Säule wurde das Enzym bei einer Ammoniumkonzentration von 0,1 - 0,15 M eluiert (Abb.5). Dabei war die Enzymaktivität mit α-Amanitin (100 µg/ml) nicht hemmbar. Diese Insensitivität gegenüber α-Amanitin und die Eluationsprofile nach Phosphocellulose- und DEAE-Cellulose-Chromatographie zeigen eindeutig, daß es sich bei dem gereinigten Enzym um RNA-Polymerase I handelt.

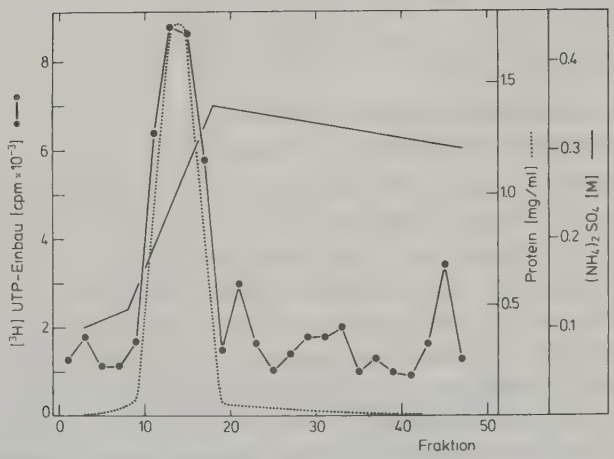

Abb.4: Phosphocellulose-Chromatographie (PC 1).
Die Säule wurde nach 2.5.1. vorbehandelt und die Auftrennung nach 2.5.3.3. durchgeführt. Die Fraktionen 1o - 17 wurden gesammelt. ●—● RNA-Polymerase-Aktivität, bestimmt nach 2.9.1. ····· Proteingehalt, bestimmt nach Lowry et al. (1951). —— $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration.

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg)	Enzymeinheiten (units)	Spezifische Aktivitat (units/mg Protein)	Reinheit (-fach)	Ausbeute (%)
Chromatin	134	1900	1135	0,6	1	100
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung						
DEAE-Cellulose (Batch)						
Phosphocellulose (Batch)						
1.Phosphocellulose Säule (PC 1)	20	24	1060	44	74	94
DEAE-Cellulose Säule (DE)	15	17	910	53	89	80
2.Phosphocellulose Säule (PC 2)	12	8,6	480	56	93	42
Saccharose-Gradient (Aliquot)				80	134	28

Tabelle 1: Reinigung der Petersilie-RNA-Polymerase I.
1 Enzymeinheit (unit) ist die Enzymaktivität, die unter den Testbedingungen in 30 min den Einbau von 1 nMol [^{3}H] UMP als säurefällbare Fraktion bewirkt.

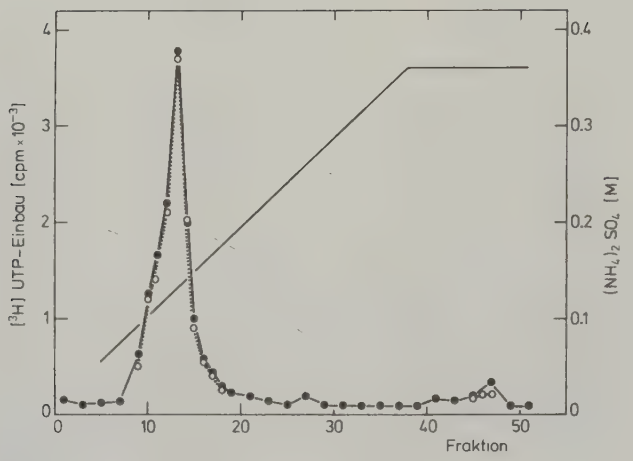

Abb.5: DEAE-Cellulose-Chromatographie (DE).
Die gesammelten Fraktionen von PC 1 wurden auf die DE-Säule aufgetragen und nach 2.5.3.4. eluiert. Fraktionen 9 - 17 wurden vereinigt. ●—● RNA-Polymerase-Aktivität; O····O RNA-Polymerase-Aktivität in Anwesenheit von 100 µg/ml α-Amanitin; ——— $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration.

Die nachfolgende Auftrennung auf einer weiteren Phosphocellulose-Säule ergab eine Enzymreinigung von 93-fach bei einer Ausbeute von 42 % (Abb.6, Tabelle 1). Der Reinheitsgrad konnte durch eine anschließende Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation auf 134-fach verbessert werden bei einer spezifischen Aktivität von 80 units/mg Protein.

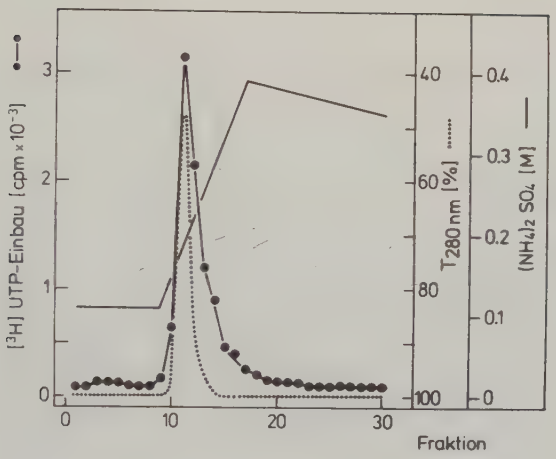

Abb.6: Zweite Phosphocellulose-Chromatographie (PC 2). Die aktiven Fraktionen nach der DE-Säule wurden auf eine weitere Phosphocellulose-Säule aufgetragen und nach 2.5.3.5. weiterbehandelt. Fraktionen 1o - 16 wurden vereinigt. ●—● RNA-Polymerase I Aktivität; ····· Transmission bei 28o nm; —— $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration.

3.3.1. Polyacrylamidgel - Elektrophorese

Die Struktur der Untereinheiten der gereinigten RNA-Polymerase I wurde mit Hilfe von denaturierenden Polyacrylamidgelen untersucht. Die Auftrennung fand dabei auf gemischten Gelen statt, deren obere Hälfte 5 % und unten 1o % Acrylamid aufwies. Das Trennprofil (Abb. 7) läßt 1o Banden erkennen. Während eine Bande mit einem Molekulargewicht von 185 ooo im 5 % Gel erscheint, können 9 Banden mit den Molekulargewichten 15o ooo, 13o ooo, 11o ooo, 92 ooo, 78 ooo, 7o ooo, 47 ooo, 37 ooo und 3o ooo im unteren 1o % Gel ausgemacht werden. Das hochmolekulare Polypeptid von 185 ooo

Molekulargewicht ist nur sehr schwach ausgeprägt, was auf einen Zerfall dieser Komponente während der Elektrophorese schließen läßt.

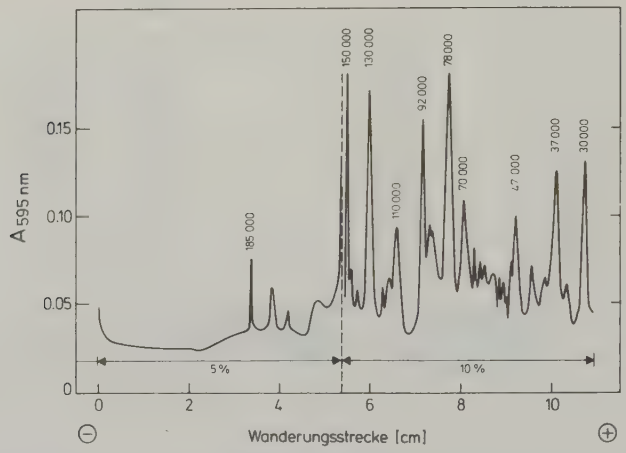

Abb.7: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Trennprofil). RNA-Polymerase I aus Petersilie wurde nach 2.5.3. gereinigt. "Slab"-Gele wurden nach 2.5.4. bereitet und wiesen ein gemischtes Trenngel mit 5 % und 1o % (unten) Acrylamidkonzentration auf. Nach der Elektrophorese wurde das Gel angefärbt und in Bahnen zugeschnitten und einzeln in einem Gilford Spektrophotometer 25o vermessen.

Verglichen jedoch mit der Struktur der Untereinheiten bei Hefe (Hager et al. 1977), Sojabohne (Guilfoyle et al. 1976) und Blumenkohl (Guilfoyle 1976) könnte dieses Protein eine der hochmolekularen Untereinheiten der Petersilien-RNA-Polymerase I darstellen. Folgende Banden mit den Molekulargewichten 185 ooo, 13o ooo, 7o ooo, 47 ooo, 37 ooo und 3o ooo können als weitere vermeintliche Untereinheiten des Enzyms angesehen werden. Die übrigen Banden stellen wahrscheinlich Kontaminationen oder Fragmente der hochmoleku-

laren Untereinheit dar.

3.3.2. Auftrennung von Sojabohnen-RNA-Polymerase I an rDNA-Sepharose

Isolierte Sojabohnen-RNA-Polymerase I wurde einer Affinitätschromatographie unterworfen, die Plasmid-DNA mit Sojabohnen-rRNA-Genen als Insert an Sepharose-4B gekoppelt enthielt. Nach Friedrich (persönliche Mitteilung) bindet die Sojabohnen-RNA-Polymerase I bei einer KCl-Konzentration von 5o mM in vitro für 5 min an das rDNA-Insert des Plasmids. Mit Hilfe der DNA Protektion des Bindungskomplexes Enzym-Promotorstelle und der Restriktionsenzymanalyse konnte ebenfalls gezeigt werden, daß nach einer Inkubationsdauer von 5 min wieder die Ablösung der Polymerase von ihrer Bindungsstelle erfolgt, während durch Herabsetzen der Inkubationstemperatur und durch drastische Verdünnung der KCl-Konzentration im Medium der Bindungskomplex für längere Zeit stabilisiert werden konnte. Aus diesen Gründen wurde die Bindung der Polymerase an die Säule bei 5o mM KCl-Konzentration und erniedrigter Temperatur (23°C) vorgenommen und die Säule sofort mit TMM-Puffer gewaschen, um die KCl-Konzentration zu verdünnen und den Bindungskomplex zu stabilisieren. Das in Abb.8 dargestellte Eluationsprofil gibt zu erkennen, daß schon nach dem Waschen mit TMM-Puffer ein Großteil der Enzymaktivität zusammen mit dem Hauptprotein-Peak die Säule verläßt, was auf nichtspezifische Bindung der Polymerase hindeutet. Bei der anschließenden Eluation der Säule mit einem KCl-Gradienten (o,o5 - 1 M) treten jedoch auch distinkte Enzymaktivitäts-Peaks auf, die auf eine spezifische Bindung Polymerase-Plasmid schließen lassen.

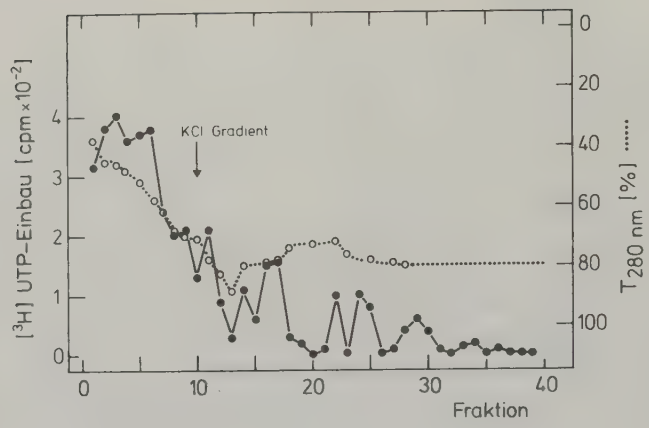

Abb.8: Affinitätschromatographie von Sojabohnen-RNA-Polymerase I an Plasmid-DNA mit Sojabohnen-rRNA-Genen als Insert gekoppelt an Sepharose-4B.
Die Affinitätschromatographie wurde nach 2.13. vorgenommen, die Enzymaktivität der von der Säule eluierten Fraktionen nach 2.1o. bestimmt.

3.4. Charakterisierung der RNA-Polymerase I aus Petersilie (Großmann et al. 198o)

3.4.1. Kinetik und Enzymkonzentration

Die Kinetik der gereinigten RNA-Polymerase I verläuft bis zu 3o min Inkubationsdauer linear (Abb. 9). Ebenso ergibt sich für die Polymerasekonzentration im Inkubationsansatz (Proteingehalt) und der Enzymaktivität eine lineare Beziehung (Inset Abb. 9).

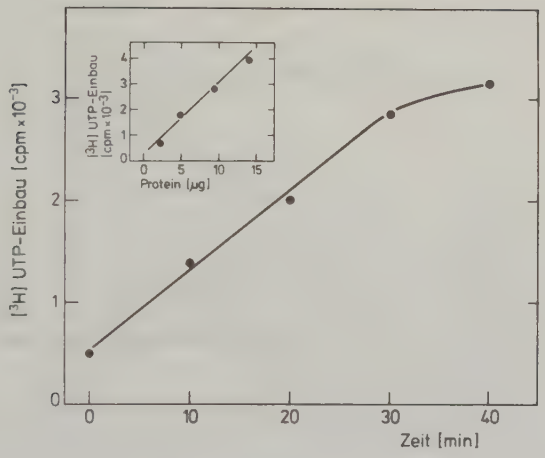

Abb.9: Kinetik des [^{3}H] UTP-Einbaus in TCA unlösliches Material. Gereinigte RNA-Polymerase I (nach PC 2) wurde verwendet und nach 2.9.1. weiterbehandelt.
Inset: Abhängigkeit des [^{3}H] UTP-Einbaus von der Enzymkonzentration.

3.4.2. Matrizen - DNA

RNA-Polymerase I aus Petersilie kann native und denaturierte Lachssperma-DNA als Matrize verwenden. Dabei wird native DNA leicht bevorzugt (Abb.1oa). Ob dies auf Nick-Transkription schließen läßt, wurde nicht untersucht. Mit isolierter Petersilie-Wurzel-DNA ergibt sich ein vergleichbarer [^{3}H] UTP-Einbau, während Poly [d(A-T)] als Matrize eine etwa doppelt so hohe Syntheserate bewirkt (Abb.1ob).

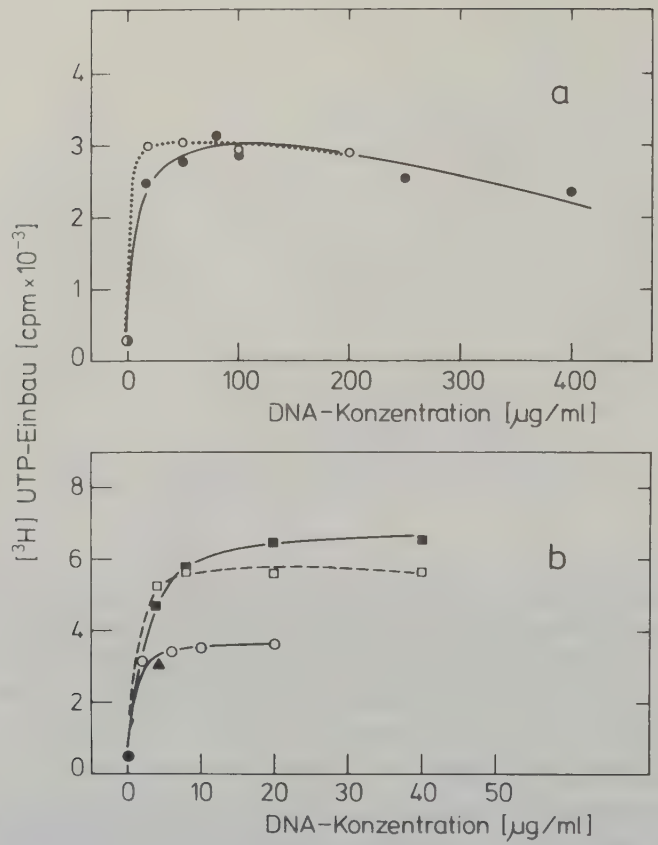

Abb.1o: Abhängigkeit von der Matrizen-DNA.
Petersilien-RNA-Polymerase I (nach PC 2) wurde mit unterschiedlicher Matrizen-DNA nach 2.9.1. inkubiert. a.) O···O native Lachssperma-DNA; ●—● denaturierte Lachssperma-DNA. b.) ■—■ denaturierte Poly[d(A-T)]; □---□ native Poly[d(A-T)]; O—O nach 2.4. isolierte Petersilien-Wurzel-DNA; ▲ denaturierte Lachssperma-DNA.

3.4.3. Einfluß von divalenten Kationen und Ionenstärke auf die RNA-Polymerase I-Aktivität

Mit denaturierter Lachssperma-DNA als Matrize ergibt sich maximale Enzymaktivität bei 1 mM $MnCl_2$ und bei 4 - 6 mM $MgCl_2$ im Inkubationsansatz. Mn^{2+}-Ionen werden dabei leicht bevorzugt (Abb.11a).

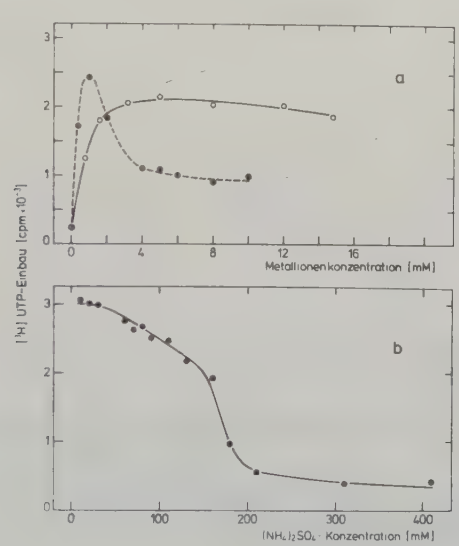

Abb.11: Einfluß von divalenten Kationen und Ionenstärke auf die Petersilien-RNA-Polymerase I (PC 2).
Die Inkubation wurde nach 2.9.1. durchgeführt.
a.) ●---● $MnCl_2$-Konzentration; O—O $MgCl_2$-Konzentration im Inkubationsansatz, bei einer Ionenstärke von 2o mM $(NH_4)_2SO_4$. b.) $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration variabel gewählt bei 1 mM $MnCl_2$ und 6 mM $MgCl_2$.

Bei optimaler Mn^{2+}- und Mg^{2+}-Ionenkonzentration im Inkubationsmedium stellt sich eine maximale Enzymaktivität bei einer Ionenstärke von 1o - 2o mM $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration ein. Eine höhere Ionenstärke führt zu einer Hemmung der

Polymeraseaktivität (Abb.11b).

3.4.3.1. Kontrollversuche

Um nun zu untersuchen, ob auch Cl^--Ionen, die mit den Metallionen in den Inkubationsansatz gebracht werden oder Na^+-Ionen, die über die Nucleosidtriphosphate in den Ansatz gelangen, einen Einfluß auf die Enzymaktivität haben, wurde NaCl getestet. Es zeigt sich in Abb.12, daß NaCl keinen Effekt auf die Polymeraseaktivität aufweist. Ebenfalls wurde der Einfluß von Äthanol auf die Enzymreaktion untersucht, da über $[^3H]$ UTP (gelöst in 50 % Äthanol) eine geringe Menge in das Inkubationsmedium gelangt (bei 4 µCi/Ansatz 0,4 % Äthanol). Es zeigt sich, daß bis zu 1 % Äthanol im Medium ohne Einfluß auf das Enzym ist (Abb.13).

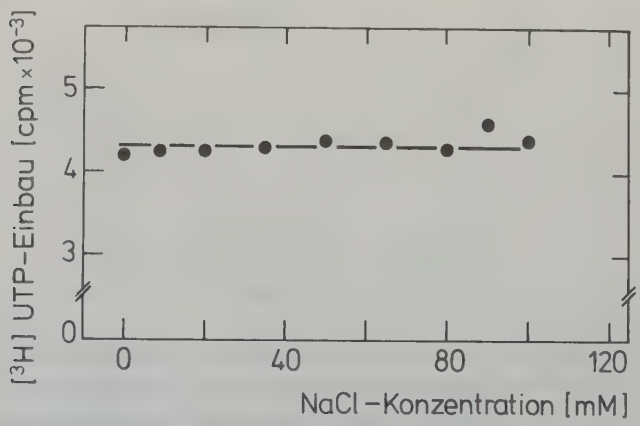

Abb.12: Einfluß von NaCl auf die RNA-Polymerase I.
Die Inkubation wurde nach 2.9.1. mit 30 µl Enzym pro Ansatz durchgeführt.

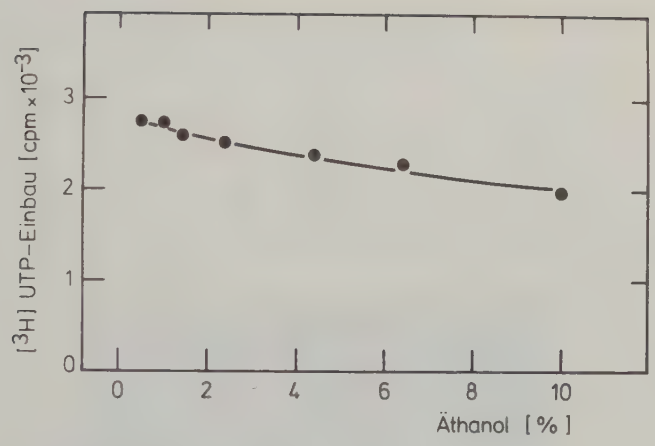

Abb.13: Einfluß von Äthanol auf die RNA-Polymerase I. Die Inkubation wurde nach 2.9.1. durchgeführt.

3.4.4. Einfluß von 3', 5'-cAMP, GA_3 und IES auf die Petersilien-RNA-Polymerase I

Aus Abb.14 ist zu entnehmen, daß weder 3', 5'-cAMP noch die Phytohormone GA_3 und IES einen Effekt auf die RNA-Polymerase I zeigen.

3.4.5. Elektrophoretische Untersuchung der in vitro-Transkriptionsprodukte

Die Transkriptionsprodukte wurden auf einem 2,1 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gelprofil in Abb.15 zeigt, daß RNA im Molekulargewichtsbereich von 19 - 38 S synthetisiert wurde. Läßt man den Peak bei 38 S außer acht, so kann man sagen, daß ein scharfer Peak mit einem Molekulargewicht von 29 S zu erkennen ist. Bei diesem distinkten Peak könnte es sich um eine Vorstufe der reifen ribosomalen RNA handeln. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem der in vitro-Transkription von isolierten Petersilie-Zellkernen

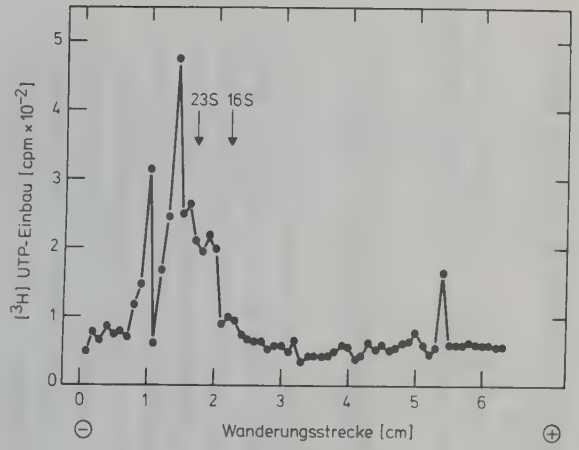

Abb.15: In vitro-Transkription mit gereinigter Petersilien-RNA-Polymerase I. Die Polymerase wurde nach 2.5. gereinigt und nach 2.9.1. mit denaturierter Petersilien-Wurzel-DNA inkubiert, die nach 2.4. isoliert wurde. Die Transkriptionsprodukte wurden nach 2.9.2. extrahiert und nach 2.12. elektrophoretisch aufgetrennt.

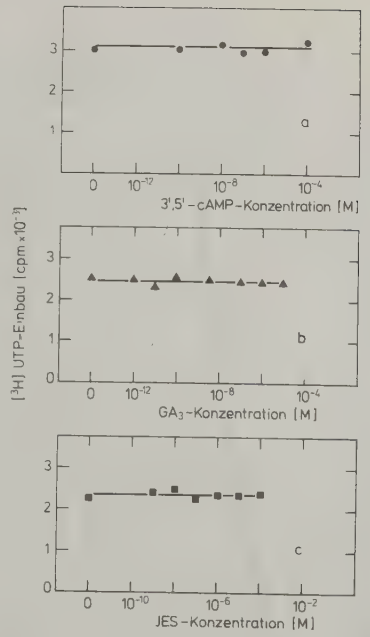

Abb.14: Einfluß von 3', 5'-cAMP, GA_3 und IES auf die gereinigte Petersilien-RNA-Polymerase I. Die Inkubation wurde nach 2.9.1. durchgeführt.

(3.2.), so kann man eine Übereinstimmung im Molekulargewicht der erhaltenen hochmolekularen Produkte feststellen.

3.4.6. Darstellung der an DNA gebundenen Petersilien-RNA-Polymerase I im Elektronenmikroskop

Nach einem von Koller et al. (1974) beschriebenen Verfahren wurde ein Aliquot des in vitro-Transkriptionsansatzes mit RNA-Polymerase I und Lachssperma-DNA als Matrize auf einem Ethidiumbromidtropfen gespreitet und elektronenmikroskopisch untersucht. Deutlich sind die Polymerasemoleküle mit einem Durchmesser von etwa 15 nm gebunden an die Lachssperma-DNA zu erkennen (Abb.16).

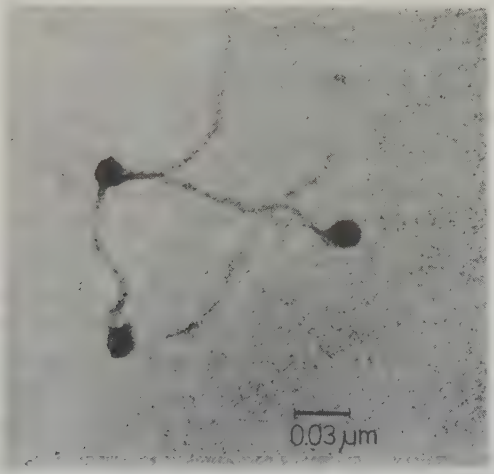

Abb.16: Elektronenmikroskopische Darstellung der RNA-Polymerase I. Isolierte Petersilien-RNA-Polymerase I wurde nach 2.9.1. mit Lachssperma-DNA als Matrize inkubiert und nach 2.14. elektronenmikroskopisch dargestellt.

Leider reicht die Auflösung des elektronenmikroskopischen Bildes nicht aus, um eine exakte Aussage über die RNA-Synthese zu geben. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, im in vitro-Transkriptionsansatz mit isolierter eukaryontischer RNA-Polymerase die ablaufende RNA-Synthese sichtbar zu machen (Spring, Heidelberg; persönliche Mitteilung).

3.5. Charakterisierung der RNA-Polymerase I isoliert aus der Sojabohne

3.5.1. Kinetik und Enzymkonzentration

Die Kinetik der gereinigten RNA-Polymerase I aus Sojabohne verläuft bis zu 3o min Inkubationsdauer linear (Abb.17a). Ebenso ergibt sich für die Enzymkonzentration und Syntheseaktivität eine lineare Beziehung (Inset Abb.17a).

3.5.2. Abhängigkeit von divalenten Kationen

Mit denaturierter Lachssperma-DNA als Matrize und einer Ionenstärke von 5o mM $(NH_4)_2SO_4$ im Inkubationsmedium, ergibt sich maximale Enzymaktivität bei 1 - 2 mM $MnCl_2$ und 4 - 1o mM $MgCl_2$ (Abb.17b).

3.5.3. Einfluß der $(NH_4)_2SO_4$- und KCl-Konzentration

Bei einer optimalen Mg^{2+}-Ionenkonzentration im Inkubationsmedium stellt sich eine maximale Enzymaktivität bei einer Ionenstärke von 5o mM $(NH_4)_2SO_4$ ein (Abb.18a). Bei optimaler Mn^{2+}-Konzentration sind 5o - 1oo mM $(NH_4)_2SO_4$ für das Erreichen maximaler Enzymaktivität notwendig. Dieser Wert wird ebenfalls erhalten, wenn optimale Konzentrationen von $MgCl_2$ und $MnCl_2$ gleichzeitig im Testansatz vorlagen. Es scheint, als ob $MgCl_2$ leicht bevorzugt wird (Abb.18a).
Bei Bindungsstudien mit Sojabohnen-RNA-Polymerase I und clonierten rRNA-Genen aus Sojabohne hat sich gezeigt, daß die Polymerase bei 5o mM KCl in vitro an die DNA bindet (Friedrich, persönliche Mitteilung). Bei in vitro-Ansätzen ergibt sich ebenfalls maximale Enzymaktivität bei Zugabe von KCl anstelle von $(NH_4)_2SO_4$ (Abb.18b).

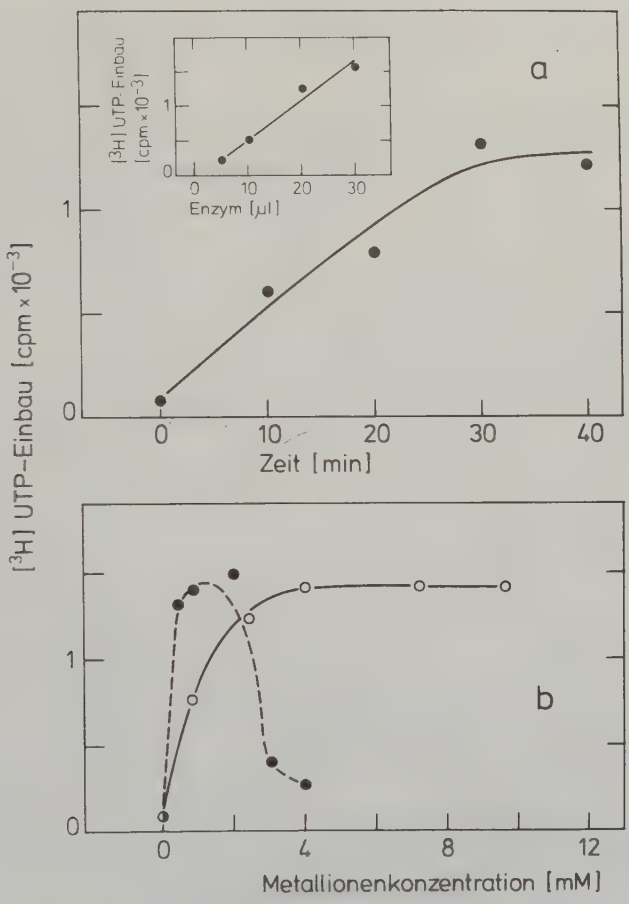

Abb.17: Charakterisierung der RNA-Polymerase I.
RNA-Polymerase I aus Sojabohne wurde nach 2.6. isoliert und nach 2.1o.1. inkubiert. a.) Zeitabhängigkeit der Enzymreaktion. Inset: Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. b.) Abhängigkeit von divalenten Kationen bei einer Ionenstärke von 5o mM $(NH_4)_2SO_4$: ●---● $MnCl_2$-Konzentration; O—O $MgCl_2$-Konzentration.

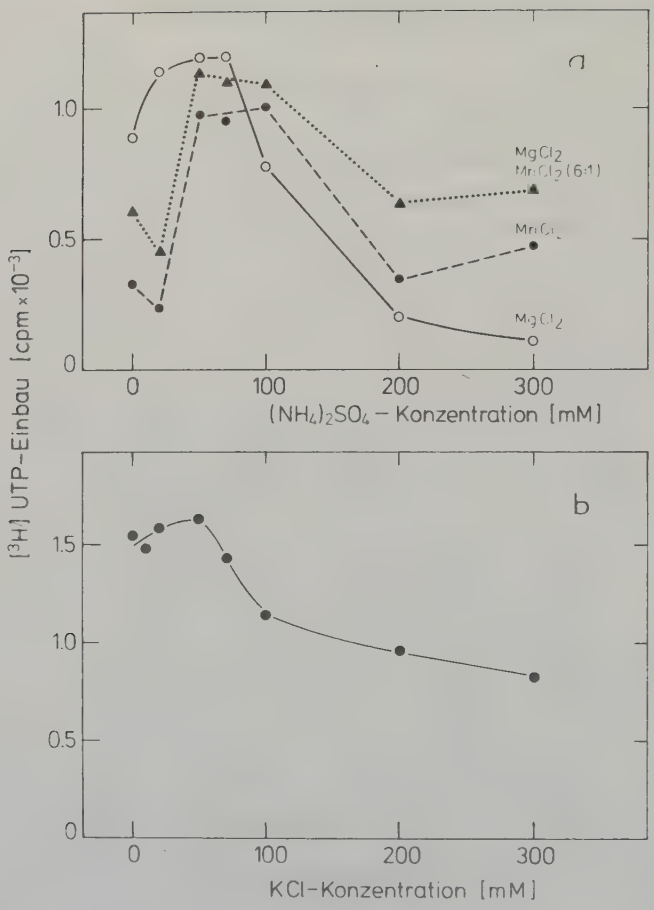

Abb.18: Charakterisierung der RNA-Polymerase I aus Sojabohne. a.) Abhängigkeit von der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration. O—O mit 6 mM $MgCl_2$, ●---● mit 1 mM $MnCl_2$, ▲···▲ mit 6 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$ im Inkubationsansatz. b.) Abhängigkeit von der KCl-Konzentration (6 mM $MgCl_2$, kein $(NH_4)_2SO_4$).

3.6. Charakterisierung der RNA-Polymerase aus Escherichia coli MRE 600

Die Kinetik gereinigter RNA-Polymerase aus E.coli verläuft bis zu 20 min Inkubationsdauer linear (Abb.19a). Ebenso ergibt sich für die Enzymkonzentration und Syntheseaktivität eine lineare Beziehung (Abb.19b).

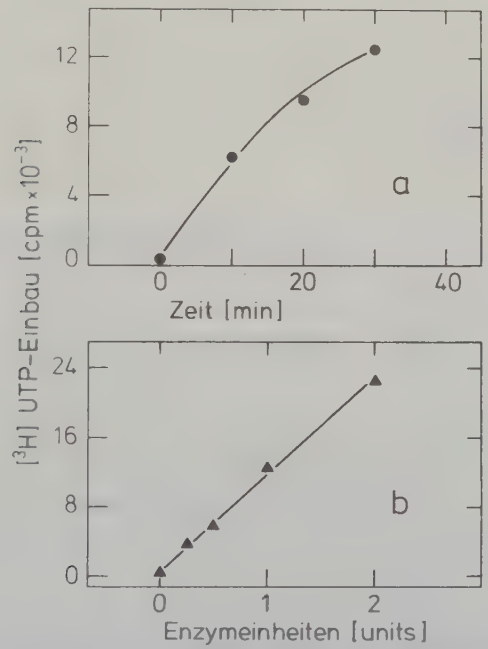

Abb.19: Charakterisierung der RNA-Polymerase aus E.coli. E.coli-RNA-Polymerase wurde nach 2.11.1. inkubiert und der Einbau von [^{3}H] UTP in fällbares Material bestimmt. a.) Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität. Pro Ansatz wurde 1 unit Polymerase verwandt. b.) Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Mit denaturierter Lachssperma-DNA als Matrize zeigt sich eine maximale Enzymaktivität bei 8 mM $MgCl_2$ (Abb.19c) und einer Ionenstärke von 75 mM KCl (Abb.19d).

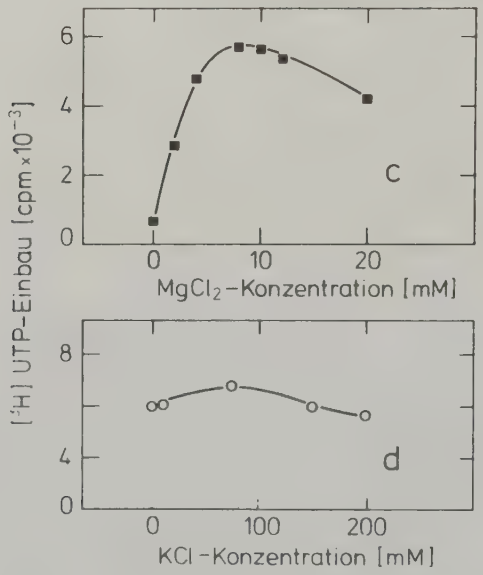

Abb.19: Charakterisierung der RNA-Polymerase aus E.coli. c.) Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration. Pro Ansatz wurde o,5 unit Polymerase verwandt. Die KCl-Konzentration betrug 5o mM. d.) Abhängigkeit von der KCl-Konzentration. Pro Ansatz wurde o,5 unit Polymerase verwandt. Die $MgCl_2$-Konzentration betrug 1o mM.

3.7. Phosphatase-Aktivität in isolierten Petersilie-Zellkernen (Großmann et al. 1979b)

Petersilie-Zellkerne wurden nach 2.2. isoliert und die Phosphatase-Aktivität nach 2.15. an Hand des bei der Reaktion freigesetzten anorganischen Phosphats über Komplexbildung mit Molybdovanadat bestimmt. Um zu beweisen, daß die so bestimmte Phosphatase-Aktivität der Zellkerne nicht eine Kontamination cytoplasmatischer Phosphatasen darstellt, wurde Chromatin nach 2.3. aus Petersilie-Suspensionszellen isoliert. Auch dieses sehr gründlich gereinigte Chromatin wies eine hohe Phosphatase-Aktivität auf, was darauf schliessen läßt, daß wir es mit einer chromatingebundenen Enzymaktivität zu tun haben.

3.7.1. Substratabhängigkeit

Tabelle 2 zeigt die Phosphatase-Aktivität mit unterschiedlichen Substraten. Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Nucleosidtriphosphate (äquimolar mit 7 mM $MgCl_2$ im Inkubationsmedium) mit Ausnahme von UTP in gleicher Weise als Substrat anerkannt werden. Mit Nucleosiddiphosphaten hingegen erhalten wir ein unterschiedliches Bild. Während ADP kein Substrat darstellt, GDP und UDP nur wenig gespalten wird, bedingt CDP im Vergleich mit NTP ähnliche Enzymaktivität. p-Nitrophenylphosphat (pNP), das bekannterweise den unterschiedlichsten Phosphatasen als Substrat dienen kann, ergibt eine sehr hohe Phosphat-Freisetzung. Ebenso weisen die Zellkerne eine sehr hohe Pyrophosphataseaktivität auf. Pyrophosphat wird im Zellkern bei dem Vorgang der Transkription, der Replikation und durch die NAD-Pyrophosphorylase bei der NAD-Synthese freigesetzt und stellt, wenn es nicht sofort im Zellkern abgebaut wird ein Hemmstoff der RNA-Synthese dar (siehe 3.1o.5.). Mg^{2+}-Ionen werden im übrigen gegenüber Ca^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen leicht bevorzugt.

Substrat (7 mM)	Phosphatase - Aktivität (µMol P_i . mg^{-1} Protein . h^{-1})
ATP . Mg	1o3,8 ± 11,2
GTP . Mg	121,6 ± 18,3
UTP . Mg	71,6 ± 3,9
CTP . Mg	118,1 ± 1,3
ADP . Mg	keine
GDP . Mg	51,5 ± 2,5
UDP . Mg	71,4 ± 2,9
CDP . Mg	11o,5 ± 8,3
pNP . Mg	214,1 ± 5,5
NaPi . Mg	155,4 ± 6,9
ATP . Mg	113,9 ± 2,5
ATP . Ca	1o2,4 ± 1,7
ATP . Mg	1o4,5 ± 4,4

Tabelle 2: Substratabhängigkeit der Phosphatase-Aktivität isolierter Zellkerne.
Petersilie-Zellkerne wurden nach 2.2. isoliert und die Phosphatase-Aktivität nach 2.15. mit 7 mM Metallionen und 7 mM der angegebenen Substanzen bestimmt.

3.7.2. Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und vom pH-Wert

Die Kinetik der Phosphatase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne verläuft über 6o min Inkubationsdauer linear (Abb.2oa). Ein pH-Wert von 5,5 im Inkubationsmedium stellt sich als sehr günstig für die Phosphatase-Aktivität heraus. Das pH-Optimum der Enzymaktivität bei pH 5,5 weist jedoch noch eine Schulter auf, deren Optimum bei pH 7 zu suchen

ist (Abb.2ob). Ob dieser Verlauf der Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert auf zwei überlappende Phosphatase-Aktivitäten mit unterschiedlichen pH-Optima schließen läßt, bleibt fraglich.

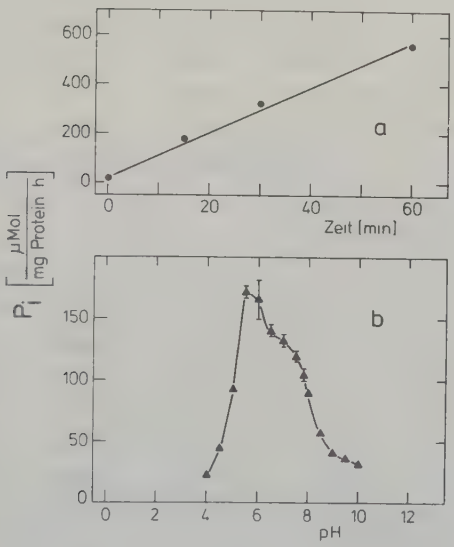

Abb.2o: Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität isolierter Petersilien-Zellkerne von der Inkubationsdauer und vom pH-Wert.
Petersilien-Zellkerne wurden nach 2.15. mit 7 mM ATP und 7 mM $MgCl_2$ inkubiert. a.) Inkubationsdauer; b.) pH-Wert variabel (die Fehlerbalken geben die unverzerrte Standartabweichung an).

3.7.3. Überprüfung der Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die Phosphatase-Aktivität

Verschiedene Substanzen wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Phosphatase-Aktivität untersucht. Inhibitoren der mitochondrialen ATPase wie Oligomycin und Quabain hemmen die Reaktion nicht, selbst wenn sie in sehr hoher Konzentration zugegeben werden (1o µg/ml). Mit Hemmstoffen der Transkription, wie α-Amanitin (1o µg/ml, 2o µg/ml), Actinomycin D (1o µg/ml, 2o µg/ml) und der Translation, wie Cycloheximid (2o µg/ml), erfolgt ebenfalls in den angegebenen Konzentrationen keine Verminderung der Phosphatase-Aktivität.

3.7.4. Einfluß von Phytohormonen und deren Analoge auf die Phosphatase-Aktivität

Isolierte Petersilie-Zellkerne wurden nach 2.15. mit 7 mM ATP und 7 mM $MgCl_2$ inkubiert. Der Einfluß folgender Phytohormone und Analoge in den Konzentrationen $1o^{-4}$ M - $1o^{-12}$ M auf die Phosphatase-Aktivität wurde untersucht: Indolessigsäure, α-Naphtylessigsäure, das Analoge ß-Naphtylessigsäure, 2,4 - Dichlorphenoxy-essigsäure (2,4 - D) und das Analoge 3,5 - D. Alle überprüften Substanzen weisen keinen direkten Einfluß auf die Phosphatase-Aktivität auf. Natürlich muß dies nicht bedeuten, daß auch in vivo keine Wirkung auf die Phosphatasen im Zellkern besteht, da Zellkerne, die mit wässrigen Medien isoliert wurden, leicht lösliche, niedermolekulare Proteine, Rezeptor- oder Mediatormoleküle der Phytohormone, verlieren können.

3.8. Bestimmung der in vitro-Transkription und des Transports synthetisierter RNA bei isolierten Petersilie-Zellkernen (Großmann et al. 1979a, b)

Isolierte Petersilien-Zellkerne (2.2.) wurden in einem zellfreien System inkubiert (2.8.1.). Die RNA-Synthese konnte über den Einbau von $[^3H]$-UMP in die TCA-fällbare Fraktion gemessen werden. Dabei erlaubte die Anwendung einer neuentwickelten Filtrationstechnik (2.8.1.), daß nach der Inkuba-

tion der Kerne die RNA-Synthese, repräsentiert durch die gemessene Radioaktivität der Kernfraktion auf dem Filter und der RNA-Transport, repräsentiert durch die gemessene Radioaktivität der fällbaren Fraktion im Filtrat, gleichzeitig untersucht werden konnte. Ein weiterer Vorteil der Filtrationstechnik lag darin, daß die Aufarbeitung der Proben in kurzer Zeit erfolgen konnte und die Methode eine exakte Standardisierung möglich machte. Damit konnten Reaktionen der RNA-Synthese und des RNA-Transports bei verschiedenen Parametern (Großmann 1978, et al. 1979a) gleichzeitig untersucht werden.

3.8.1. Einfluß von divalenten Kationen und Nucleosidtriphosphaten auf den RNA-Transport

Die Regulierung der RNA-Freisetzung aus Zellkernen durch divalente Kationen und Nucleosidtriphosphaten wurde bisher sehr eingehend bei tierischen Zellen untersucht. Über einen Einfluß dieser Substanzen auf den RNA-Transport pflanzlicher Zellkerne ist dagegen nichts bekannt. Aus diesem Grunde wurde mit Hilfe der Filtrationstechnik der Transport in vitro-synthetisierter RNA bei isolierten Petersilie-Zellkernen näher untersucht. Aus Abb.21a geht hervor, daß die Freisetzung von RNA aus Zellkernen stimuliert wird, wenn Äquimolarität zwischen Nucleosidtriphosphaten und divalenten Kationen erreicht wird. Übersteigt die ATP-Konzentration dieses Verhältnis, dann bleibt das hohe Niveau des RNA-Transports erhalten. Wird ATP teilweise durch NaPP ersetzt (Abb.21b), so kommt es mit ansteigender NaPP-Konzentration in Gegenwart von 4 mM NTP (1 mM ATP, GTP, UTP und CTP) und 7 mM divalente Kationen ebenfalls zu einer Stimulation. In diesem Fall nun ist die NaPP- und NTP-Konzentration zusammengenommen derjenigen der divalenten Kationen äquivalent. Mit weiter ansteigender NaPP-Konzentration nimmt der RNA-Transport wieder ab. Dies besagt, daß ATP teilweise durch eine Substanz ersetzt werden kann, die mit divalenten Kationen Komplexe bildet und so deren hemmenden Einfluß auf die RNA-Freisetzung verhindert.

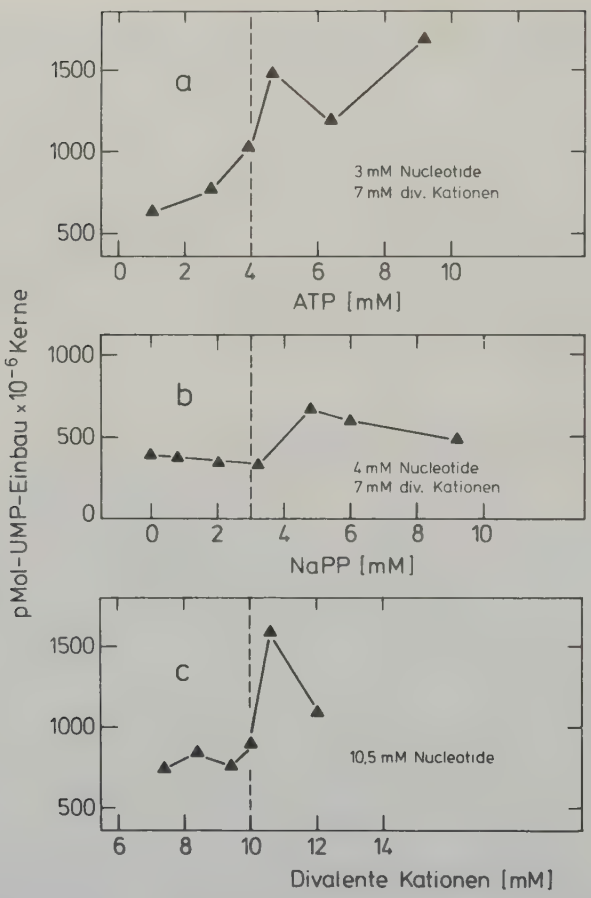

Abb.21: RNA-Transport unter verschiedenen Bedingungen.
a.) ATP-Abhängigkeit. Die folgenden Bestandteile des Inkubationsansatzes (2.8.1.) sind unter anderem konstant: 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM Mg Cl_2 (7 mM insgesamt); 1 mM je UTP, GTP, CTP. Die ATP-Konzentration wurde von 1 - 9 mM variiert.
b.) NaPP-Einfluß. Folgende Bestandteile waren konstant: 7 mM divalente Kationen (a.); 1 mM je ATP, GTP, UTP, CTP (4 mM insgesamt). Die NaPP-Konzentrtion wurde von o - 9 mM variiert.

c.) Einfluß divalenter Kationen. Folgende Bestandteile waren konstant: 1 mM je GTP, UTP, CTP; 7,5 mM ATP (1o,5 mM insgesamt); 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$. Die Mg^{2+}-Konzentration wurde von 5 - 1o mM variiert. Die gestrichelte, vertikale Linie kennzeichnet ein Nucleotid (mit NaPP in b.) : divalenten Kationen Verhältnis von 1.

Beobachtet man den RNA-Transport in Gegenwart von 1o,5 mM NTP (7,5 mM ATP; 1 mM je GTP, UTP, CTP) und ansteigender divalenter Kationenkonzentration, so tritt wieder eine Stimulation ein, wenn das Verhältnis NTP : Kationen ungefähr 1 ist. Bei einem Verhältnis kleiner oder größer 1 ist die RNA-Freisetzung vermindert (Abb.21c).
Läßt man die NTP- und divalente Kationenkonzentration im Verhältnis 1 : 1 gleichzeitig ansteigen, so nimmt der RNA-Transport aus den Zellkernen ab (Abb.22a). Dies ist sogar dann der Fall, wenn ATP teilweise durch den Komplexbildner EDTA ersetzt wird (Abb.22b).
Diese in vitro-Versuche zeigen auf, daß maximale RNA-Freisetzung aus Zellkernen dann erreicht wird, wenn divalente Kationen und Nucleosidtriphosphate im Verhältnis 1 : 1 im Inkubationsmedium zugegen sind. Mit ansteigender Konzentration beider Komponenten im Verhältnis 1 : 1 wird der RNA-Transport gehemmt. Weiter darf gefolgert werden, daß freie divalente Kationen, die nicht durch NTP und EDTA komplexiert vorliegen, den RNA-Transport vermindern, während freie NTP den erhöhten RNA-Transport aufrechterhalten.

3.9. Einfluß von divalenten Kationen und Nucleosidtriphosphaten auf die Petersilien-RNA-Polymerase I-Aktivität (Großmann et al. 198o)

In einer Reihe von Experimenten wurde der Einfluß von Nucleosidtriphosphaten und divalenten Kationen auf die in vitro-RNA-Synthese mit isolierter Petersilien-RNA-Polymerase I studiert. Im Versuch, dargestellt in Abb.23, wurde die ATP-Konzentration variiert in Gegenwart von o,84 mM der übrigen NTP (o,4 mM je GTP, CTP und o,o4 mM UTP) bei unterschiedlich-

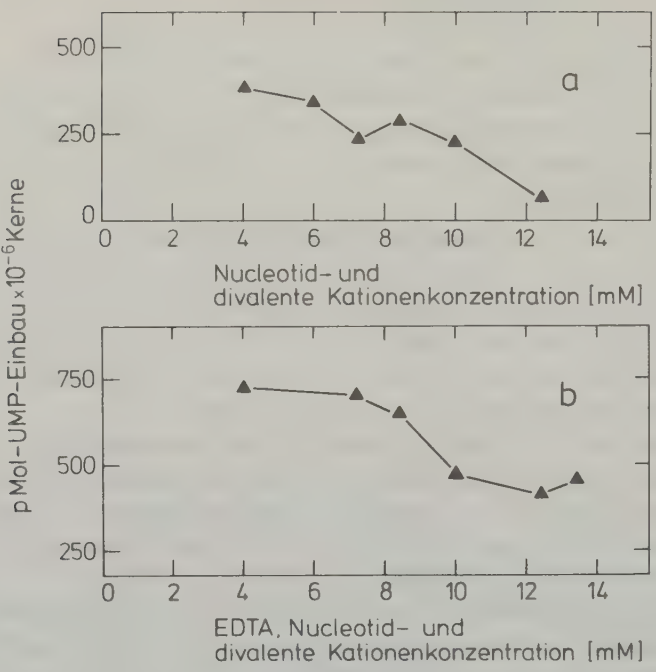

Abb.22: Einfluß der Komplexkonzentration auf den RNA-Transport.
a.) Nucleotide und divalente Kationen im Verhältnis 1. Folgende Bestandteile waren konstant: o,5 mM je GTP, UTP, CTP; 2,5 mM ATP (4 mM insgesamt); o,5 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgCl_2$ (4 mM insgesamt). Die ATP- und $MgCl_2$-Konzentration wurde im Verhältnis 1 : 1 variiert.
b.) Divalente Kationen und Nucleotide plus EDTA im Verhältnis 1. Folgende Substanzen waren konstant: o,5 mM je GTP, UTP, CTP, ATP; 2 mM EDTA (4 mM insgesamt); divalente Kationen wie in a.) (4 mM insgesamt). Die EDTA- und $MgCl_2$-Konzentration wurde im Verhältnis 1 : 1 variiert.

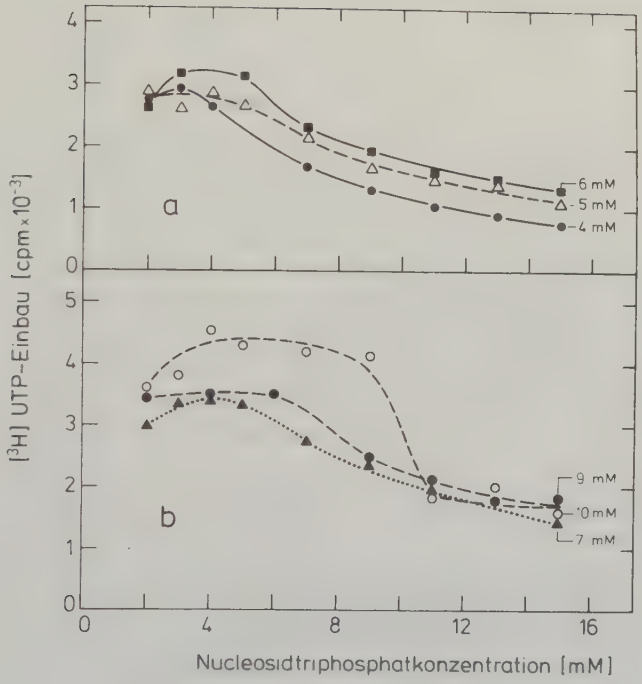

Abb.23: Einfluß von NTP und divalenter Kationen auf die Petersilien-RNA-Polymerase I.
Folgende Bestandteile des Inkubationansatzes (2.9.1.) waren konstant: o,4 mM je GTP, CTP; o,o4 mM UTP und 1 mM $MnCl_2$. ATP und $MgCl_2$ wurden variiert.
a.) ●—● 4 mM divalente Kationen (3 mM $MgCl_2$); △---△ 5 mM divalente Kationen (4 mM $MgCl_2$); ■—■ 6 mM divalente Kationen (5 mM $MgCl_2$).
b.) ▲···▲ 7 mM divalente Kationen (6 mM $MgCl_2$); ●---● 9 mM divalente Kationen (8 mM $MgCl_2$); O---O 1o mM divalente Kationen (9 mM $MgCl_2$).

er divalenter Kationenkonzentration (1 mM $MnCl_2$ und unterschiedlicher $MgCl_2$-Konzentration). Es zeigt sich, daß die RNA-Polymerase I- Aktivität abnimmt, wenn die NTP-Konzentration diejenige der divalenten Kationen übersteigt. Maximale Enzymaktivität wird im Bereich von 4 - 9 mM NTP bei 1o mM divalenter Kationen erhalten.
In einem weiteren Experiment wurde die divalente Kationenkonzentration variiert (1 mM $MnCl_2$ blieb konstant, $MgCl_2$ wurde im Bereich von 4 - 11 mM variiert) bei unterschiedlicher NTP-Konzentration (o,4 mM je GTP, CTP und o,o4 mM UTP blieb konstant, ATP variabel). Die Ergebnisse sind Abb.24abc zu entnehmen. Wieder wird maximale Enzymaktivität bei 1o mM divalenter Kationen und 4 mM NTP erreicht. Wählt man die NTP-Konzentration geringer, fällt der Einfluß der divalenten Kationen auf die Enzymaktivität weniger ins Gewicht (Abb.24a). Ebenso ist bei sehr hoher NTP-Konzentration (11, 13 und 15 mM) der Einfluß der divalenten Kationen nur sehr schwach (Abb.24c) ausgeprägt. Es muß jedoch festgestellt werden, daß unter diesen hohen NTP-Konzentrationen, verglichen mit niedrigen Werten, die Enzymaktivität auf die Hälfte vermindert wird. Andererseits wird eine sehr starke Abhänigkeit der Enzymaktivität von divalenten Kationen erreicht, wenn sich die NTP-Konzentration im Bereich von 4 - 9 mM bewegt (Abb.24b).
Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abb.25 wiedergegeben. Dabei wurde die NTP-Konzentration (o,4 mM je GTP, CTP und o,o4 mM UTP konstant, ATP variabel) und die divalente Kationenkonzentration (1 mM $MnCl_2$ konstant, $MgCl_2$ variabel)im Verhältnis 1 : 1 zueinander variiert. Es zeigt sich, daß die Enzymaktivität durch ansteigende Konzentration beider Komponenten (4 - 11 mM) im Verhältnis 1 : 1 zueinander nicht beeinflußt wird. Übersteigt die NTP-Konzentration diejenige der Kationen (NTP_{exc}), so tritt Hemmung der RNA-Polymerase ein, liegt die Kationenkonzentration dagegen über der der Nucleosidtriphosphate ($Kation_{exc}$), so tritt eine Stimulierung der Enzymreaktion ein.

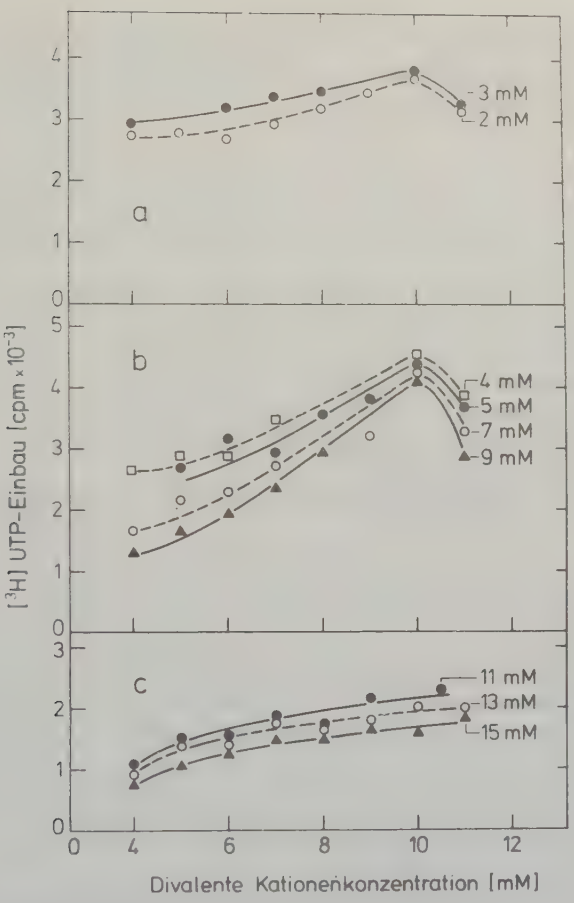

Abb.24: Einfluß von divalenter Kationen bei unterschiedlicher NTP-Konzentration auf die RNA-Polymerase I. Folgende Substanzen waren konstant: o,4 mM je GTP, CTP, o,o4 mM UTP und 1 mM $MnCl_2$. ATP und $MgCl_2$ wurden in ihrer Konzentration variiert.
a.) NTP-Konzentration im Bereich von 2 - 3 mM.
O---O 2 mM NTP (1,16 mM ATP); ●—● 3 mM NTP (2,16 mM ATP).

b.) NTP-Konzentration im Bereich von 4 - 9 mM. □---□ 4 mM NTP (3,16 mM ATP); ●—● 5 mM NTP (4,16 mM ATP); O--O 7 mM NTP (6,16 mM ATP); ▲—▲ 9 mM NTP (8,16 mM ATP).
c.) NTP-Konzentration im Bereich von 11 - 15 mM. ●—● 11 mM NTP (1o,16 mM ATP); O--O 13 mM NTP (12,16 mM ATP); ▲—▲ 15 mM NTP (14,16 mM ATP).

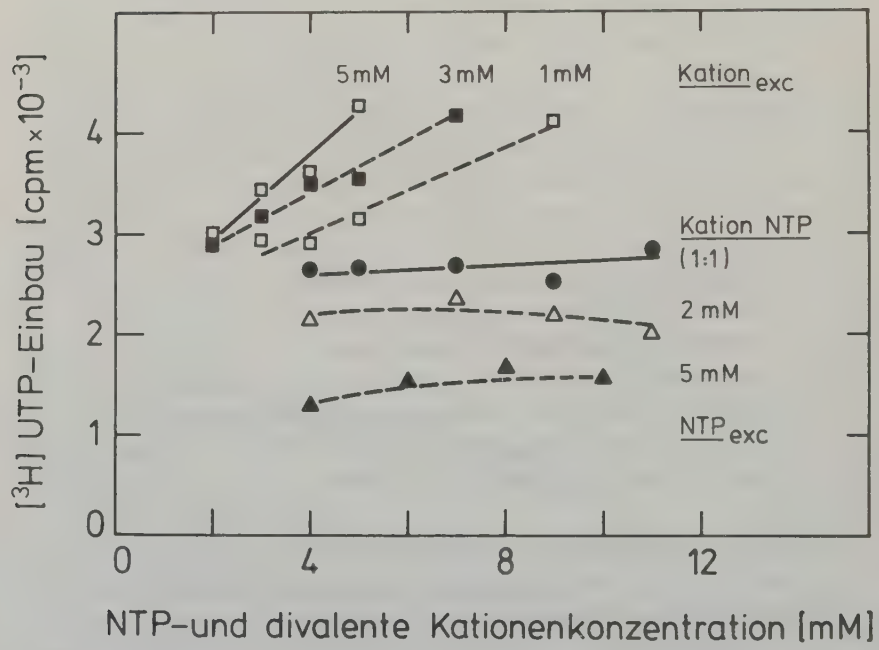

Abb.25: Einfluß von divalenten Kationen und NTP im Verhältnis 1 : 1 auf die RNA-Polymerase I. o,4 mM je CTP, GTP, o,o4 mM UTP und 1 mM $MnCl_2$ waren konstant; ATP und $MgCl_2$ wurden variiert. ●—● NTP- und divalente Kationenkonzentration im Verhältnis 1 : 1; □---□ 1 mM divalente Kationen im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis ($Kation_{exc}$); ■---■ 3 mM $Kation_{exc}$; □—□ 5 mM $Kation_{exc}$; Δ---Δ 2 mM NTP im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis (NTP_{exc}); ▲---▲ 5 mM NTP_{exc}.

3.1o. Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die RNA-Synthese isolierter Kerne und RNA-Polymerase I in Beziehung zu der Phosphatase-Aktivität bei Petersilie-Zellkernen

NTP stellen die Vorstufen der RNA-Synthese dar. Phosphatasen im Zellkern hingegen, speziell die NTPase, sind in der Lage die Konzentration dieser Vorstufenmoleküle durch enzymatischen Abbau zu vermindern. Inwieweit nun die NTP-Konzentration in Abhängigkeit von divalenten Kationen mitentscheidend bei einer Regulierung dieser Enzymaktivitäten ist, soll ein Vergleich zeigen, bei dem die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne und isolierter RNA-Polymerase I der NTPase-Aktivität der Zellkerne gegenübergestellt wird.

3.1o.1. Nucleosidtriphosphate variabel, divalente Kationen konstant

Abb.26a zeigt, daß die RNA-Synthese isolierter Petersilie-Zellkerne, wie auch der RNA-Transport (3.8.1.), mit ansteigender NTP-Konzentration (1 mM je GTP, UTP, CTP konstant, ATP variabel) und 7 mM divalenter Kationen (5 mM $MgCl_2$, 1 mM je $CaCl_2$, $MnCl_2$) stimuliert wird, wenn Äquimolarität zwischen NTP und divalenten Kationen eintritt. Übersteigt die NTP-Konzentration dieses Verhältnis, bleibt das hohe Niveau der RNA-Synthese beibehalten. Im Falle der isolierten Petersilie-RNA-Polymerase I offenbart sich ein anderes Bild (3.9.). Es zeigt sich, daß die Polymerase-Aktivität abnimmt, wenn die NTP-Konzentration (o,4 mM je GTP, CTP und o,o4 mM UTP konstant, ATP variabel) diejenige der divalenten Kationen (1 mM $MnCl_2$, 6 mM $MgCl_2$) übersteigt (Abb.26c). Dagegen erreicht die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne ihre maximale Enzymgeschwindigkeit, wenn die NTP-Konzentrtion (1 mM je GTP, CTP, UTP; ATP variabel) diejenige der divalenten Kationen (1 mM $CaCl_2$, 6 mM $MgCl_2$) übersteigt (Abb.26b). Es kann festgestellt werden, daß die NTPase-Aktivität im gleichen Konzentrationsbereich von NTP und divalenten Kationen ihre maximale Enzymgeschwindigkeit erreicht, in dem auch die Stimulierung der RNA-Synthese isolierter

Zellkerne stattfindet. Die RNA-Polymerase I hingegen wird in diesem Konzentrationsbereich gehemmt.

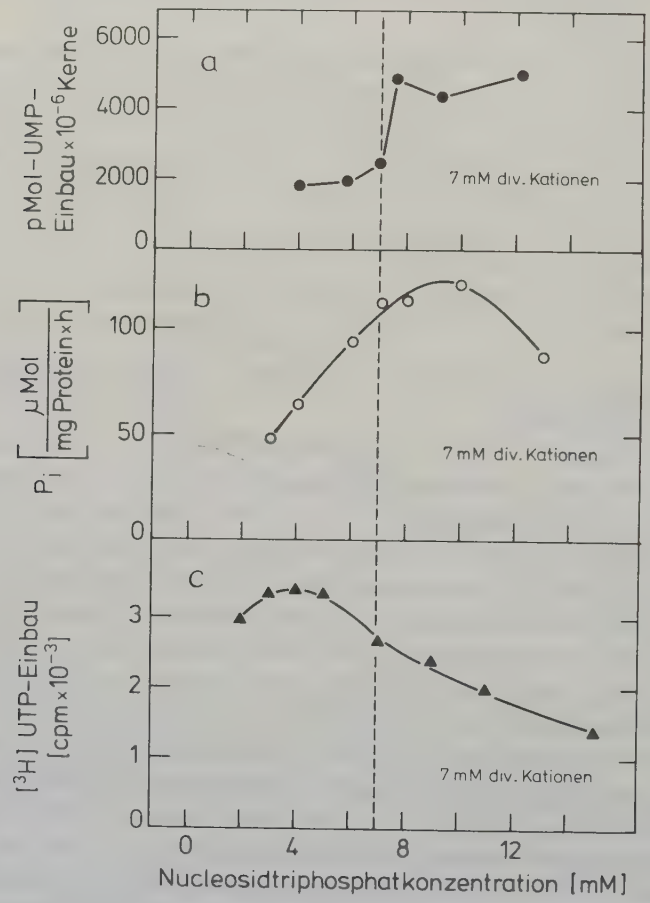

Abb.26: Einfluß von NTP bei konstanter divalenter Kationenkonzentration auf die in vitro-Transkription und NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne sowie die in vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I aus Petersilie.
a.) Petersilie-Zellkerne isoliert nach 2.2. und inkubiert nach 2.8.1. Folgende Bestandteile des Inku-

bationsmediums wurden konstant gehalten: 1 mM je $MnCl_2$, $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$ (insgesamt 7 mM divalente Kationen); 1 mM je UTP, GTP, CTP. ATP wurde im Bereich von 1 - 9 mM variabel gewählt.
b.) NTPase-Aktivität bei isolierten Petersilie-Zellkernen bestimmt nach 2.15. Im Inkubationsmedium blieben konstant: 1 mM $CaCl_2$ und 6 mM $MgCl_2$ (insgesamt 7 mM divalente Kationen); 1 mM je UTP, GTP, CTP. ATP wurde von 1 - 9 mM variiert.
c.) Petersilien-RNA-Polymerase I isoliert nach 2.5. und inkubiert nach 2.9.1. Folgende Bestandteile blieben konstant: 1 mM $MnCl_2$, 6 mM $MgCl_2$ (insgesamt 7 mM divalente Kationen); o,4 mM je GTP, CTP und o,o4 mM UTP. ATP war variabel. Die gestrichelte, vertikale Linie kennzeichnet ein NTP : Kationen Verhältnis von 1.

3.1o.2. Divalente Kationen variabel, Nucleosidtriphosphate konstant

Hält man eine sehr hohe Nucleotidkonzentration im Inkubationsansatz konstant (1o mM, davon 7 mM ATP) und variiert die Konzentration der divalenten Kationen, speziell die der Mg^{2+}-Ionen (je 1 mM $MnCl_2$, $CaCl_2$ konstant), so ergibt sich für die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne der in Abb.27a dargestellte Verlauf. Mit ansteigender divalenter Kationenkonzentration erfolgt wieder eine Stimulierung der RNA-Synthese, wenn divalente Kationen und NTP im Verhältnis 1 : 1 zueinander vorliegen. Betrachtet man die in vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I (Abb.27c), so können wir ebenfalls mit ansteigender divalenter Kationenkonzentration (1 mM $MnCl_2$ konstant; $MgCl_2$ variabel) und konstant hoher NTP-Konzentration (1o mM; davon 9,16 mM ATP) eine Stimulierung des UTP-Einbaus in fällbares Material feststellen. Dabei wird maximale Enzymgeschwindigkeit gerade dann erreicht, wenn Äquimolarität von divalenten Kationen und NTP besteht. Würde man die konstant gehaltene NTP-Konzentration (siehe Abb.24c; 3.9.) nur um 1 mM erhöhen,

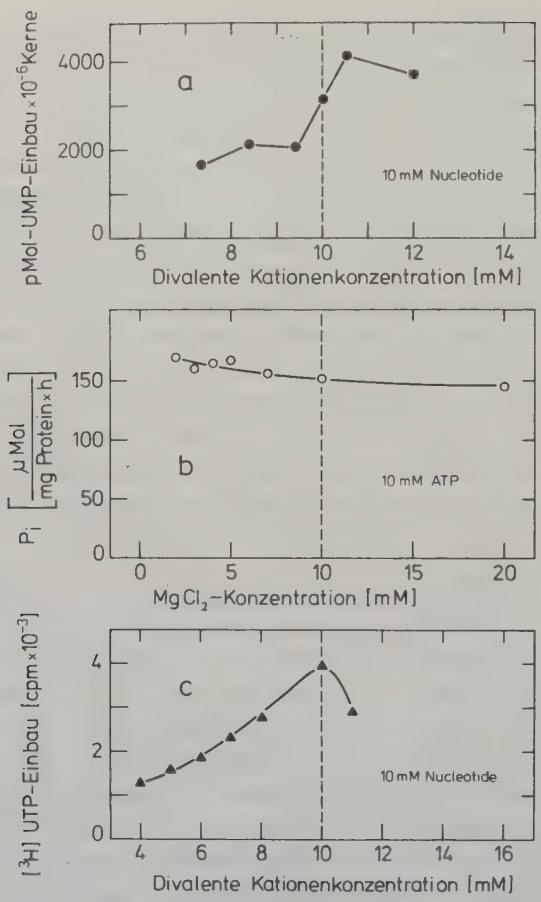

Abb.27: Einfluß von divalenten Kationen bei konstanter NTP-Konzentration auf:
a.) Die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne. Folgende Substanzen blieben konstant: 1 mM je GTP, CTP, UTP; 7 mM ATP (insgesamt 1o mM NTP); 1 mM je $MnCl_2$, $CaCl_2$. Die $MgCl_2$-Konzentration wurde variiert.
b.) Die NTPase-Aktivität isolierter Zellkerne. 1o mM ATP blieb konstant, die $MgCl_2$-Konzentration wurde variiert.

c.) Die in vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I. Folgende Substanzen blieben konstant: o,4 mM je GTP, CTP; o,o4 mM UTP; 9,16 mM ATP (insgesamt 1o mM NTP); 1 mM $MnCl_2$. Die $MgCl_2$-Konzentration wurde variiert. Die gestrichelte, vertikale Linie kennzeichnet ein NTP : Kationen Verhältnis von 1.

würde sich dies in einer allgemeinen Hemmung der RNA-Polymerase bemerkbar machen. Dies läßt darauf schließen, daß zwischen 1o und 11 mM NTP-Konzentration in gewisser Weise ein Umschlagpunkt der Polymerase-Aktivität liegt. Im Gegensatz dazu erwies sich der Einfluß ansteigender Mg^{2+}-Ionen bei konstanter ATP-Konzentration (1o mM) auf die NTPase-Aktivität isolierter Zellkerne. Über einen sehr weiten Konzentrationsbereich (2 - 2o mM $MgCl_2$) bleibt die Enzymaktivität in etwa konstant (Abb.26b). Während im Falle NTP variabel, Kationen konstant (3.1o.1.) die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne und isolierter RNA-Polymerase I einen entgegengesetzten Verlauf nimmt und sich eher im Vergleich Transkription und NTPase-Aktivität bei Zellkernen Parallelen aufzeigen, scheint im Fall Kationen variabel, NTP konstant die Stimulierung der RNA-Synthese isolierter Zellkerne zum Teil auf eine Aktivitätszunahme der RNA-Polymerase I zurückzugehen.

3.1o.3. Nucleosidtriphosphat- und divalente Kationenkonzentration im Verhältnis 1 : 1

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß von NTP (o,5 mM je GTP, UTP, CTP; ATP variabel) und divalenter Kationen (o,5 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$; $MgCl_2$ variabel) im Verhältnis 1 : 1 zueinander auf die RNA-Synthese isolierter Zellkerne untersucht (Abb.28a). Dabei zeigt sich, daß mit ansteigender Konzentration beider Komponenten im Verhältnis 1 : 1 die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne stimuliert wird. Betrachtet man Hingegen die in vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von NTP-(o,4 mM je CTP, GTP, o,o4 mM UTP; ATP variabel) und divalenter Kationenkonzentra-

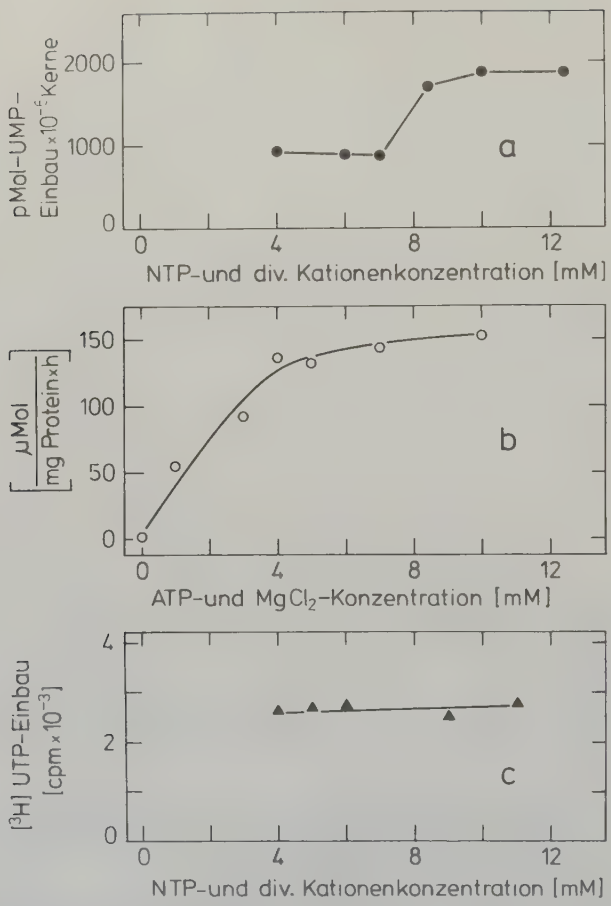

Abb.28: Einfluß von NTP und divalenten Kationen im Verhältnis 1 : 1 auf:
a.) Die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne. Folgende Substanzen blieben konstant: 0,5 mM je GTP, UTP, CTP; 2,5 mM ATP (insgesamt 4 mM); 0,5 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgCl_2$ (insgesamt 4 mM). Die ATP- und $MgCl_2$-Konzentration wurde im Verhältnis 1 : 1 variiert.

b.) Die NTPase-Aktivität isolierter Zellkerne. Die ATP- und $MgCl_2$-Konzentration wurde im Verhältnis 1 : 1 variiert.

c.) Die in vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I. Folgende Substanzen blieben konstant: o,4 mM je GTP, CTP; o,o4 mM UTP; 1 mM $MnCl_2$. ATP und $MgCl_2$ wurden so variiert, daß das Verhältnis NTP : divalenten Kationen 1 war.

tion (1 mM $MnCl_2$; $MgCl_2$ variabel) im Verhältnis 1 : 1, so ist im Bereich von 4 - 11 mM beider Komponenten kein Effekt festzustellen (Abb.28c). Was dagegen die NTPase-Aktivität isolierter Zellkerne im Falle ATP : $MgCl_2$ im Verhältnis 1 anbetrifft, so liegt ihre maximale Enzymaktivität im selben Konzentrationsbereich beider Komponenten, in dem auch die Stimulierung der RNA-Synthese isolierter Zellkerne stattfindet (Abb.28b). Eine Schlußfolgerung aus diesem Versuch wäre, daß die Stimulierung der RNA-Synthese isolierter Zellkerne nicht primär auf einer Änderung der Polymerase-Aktivität beruht, sondern eher im Zusammenhang mit der NTPase-Aktivität der Zellkerne gesehen werden muß. In den weiteren Versuchen soll diese Hypothese überprüft und der Einfluß von Substanzen, die bei den Enzymreaktionen als Produkte erscheinen, näher beleuchtet werden.

3.1o.4. Einfluß von Adenosindiphosphat

Im folgenden Versuch soll der Einfluß von ADP auf die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne und RNA-Polymerase I untersucht werden. ADP ist ein Produkt, das bei der NTPase-Reaktion entsteht und das, wie in 3.7.1. schon erwähnt, im Zellkern nicht weiter abgebaut werden kann. Es zeigt sich, daß mit ansteigender ADP-Konzentration in Anwesenheit von 4 mM NTP (1 mM je ATP, GTP, CTP und UTP) und 7 mM divalenten Kationen (1 mM je $MnCl_2$, $CaCl_2$; 5 mM $MgCl_2$) eine Abnahme in der RNA-Synthese isolierter Zellkerne zu verzeichnen ist (Abb.29a). Mit isolierter RNA-Polymerase I ergibt sich für die in vitro-Transkription bei 1,24 mM NTP (siehe 2.9.1.) und 7 mM divalenter Kationen ebenfalls eine

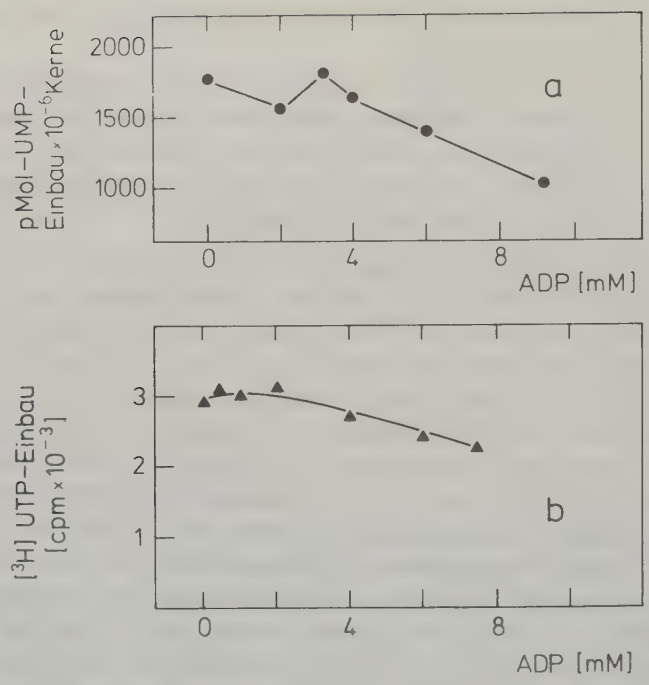

Abb.29: Einfluß von ansteigender ADP-Konzentration auf:
a.) Die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne (Inkubationsbedingungen nach 2.8.1.).
b.) Die in vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I (Inkubationsbedingungen nach 2.9.1.).

Hemmung (Abb.29b). Wir können daraus folgern, daß unter dem Einfluß von ADP die RNA-Synthese isolierter Zellkerne die RNA-Polymerase I-Aktivität widerspiegelt.

3.1o.5. Einfluß von Orthophosphat und Pyrophosphat

Es ist bekannt, daß der Vorgang der RNA-Synthese katalysiert durch die RNA-Polymerasen die Spaltung der NTP, den Einbau der Nucleosidmonophosphate in die fortlaufende RNA-Kette und die Freisetzung von Pyrophosphat zur Folge hat. Abb.13b zeigt die in vitro-Transkription mit RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von Orthophosphat und Pyrophosphat. Während Orthophosphat die Polymerase-Aktivität nicht beeinflußt, bewirkt Pyrophosphat eine sehr drastische Hemmung der Enzymaktivität. Schon bei 1 mM Pyrophosphat im Inkubationsansatz tritt eine Hemmung von 5o % auf. Im Zellkern konnte eine sehr hohe Pyrophosphatase-Aktivität festgestellt werden (3.7.1.). Sie katalysiert den Abbau von Pyrophosphat in zwei Moleküle Orthophosphat und verhindert so eine Hemmung der RNA-Polymerase durch Pyrophosphat. Im Unterschied dazu ist in Abb.3oa zu erkennen, daß die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne mit ansteigender Pyrophosphatkonzentration stimuliert wird. Ein Vergleich mit der in Abb.26a durch ansteigende NTP-Konzentration erhaltene Stimulation ergibt, daß diese doppelt so hoch wie die Pyrophosphat-Stimulation ist.

Man muß davon ausgehen, daß das angebotene Pyrophosphat sehr rasch durch die Pyrophosphatase-Aktivität im Zellkern abgebaut wird. Dadurch kann die Stimulation der RNA-Synthese durch Pyrophosphat nur auf eine Erhöhung des Orthophosphatpools im Zellkern zurückgeführt werden.Die Unterschiede in der RNA-Synthese isolierter Zellkerne und RNA-Polymerase I wären aus diesem Grund gerade dadurch zu erklären, daß die Phosphatase-Aktivität durch Spaltung von NTP oder Pyrophosphat den Orthophosphatpool im Zellkern erhöht. ADP hingegen kann nicht enzymatisch gespalten werden und trägt somit nicht zur Erhöhung des Pools bei (siehe 3.1o.4.). Dieser Orthophosphatpool beeinflußt dabei nicht direkt die RNA-Polymerase I (Abb.3oa), sondern wirkt eher indirekt über eine Veränderung der Chromatinstruktur auf die Transkription ein (Libanti und Tandler 1969).

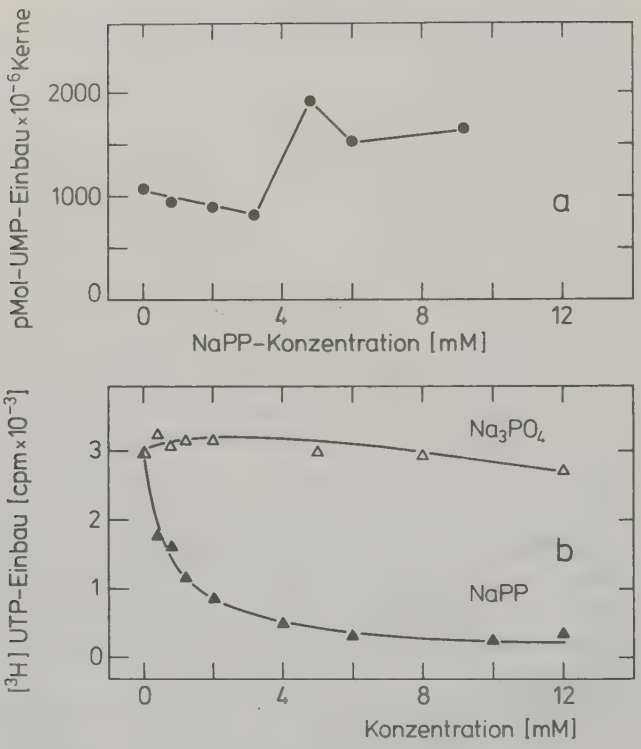

Abb.3o: Einfluß von Orthophosphat und Pyrophosphat auf die RNA-Synthese.
a.) In vitro-Transkription isolierter Zellkerne in Abhängigkeit von Natriumpyrophosphat (Inkubationsbedingungen nach 2.8.1.).
b.) In vitro-Transkription isolierter RNA-Polymerase I. △—△ Na_3PO_4-Abhängigkeit; ▲—▲ Natriumpyrophosphat-Abhängigkeit (Inkubationsbedingungen nach 2.9.1.).

3.11. Enzymkinetische Studien mit RNA-Polymerase I höherer Pflanzen (Großmann et al. 1979, Großmann und Seitz 1979)

In den bisherigen Versuchen wurde das Verhalten der isolierten Petersilie-RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von divalenten Kationen und NTP untersucht. Lagen beide Komponenten von 4 - 11 mM in äquimolarer Konzentration vor, ergab dies keine Beeinflussung der RNA-Synthese. Es schien, als ob dieser Konzentrationsbereich die Substratsättigung des Enzyms repräsentierte. Wurden jedoch NTP oder divalente Kationen im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis angeboten, führte dies zu unterschiedlicher Beeinflussung der Polymerase-Aktivität (3.9.). Für eine weiterführende Aufklärung der Enzymreaktion ist es nun unerlässlich, das enzymkinetische Verhalten der RNA-Polymerase I zu untersuchen.

3.11.1. Einfluß der Substratkonzentration auf die Petersilien-RNA-Polymerase I

Der Versuch dargestellt in Abb.31 zeigt die Polymerase-Aktivität bei ansteigender NTP-Konzentration (ATP, GTP, CTP in gleicher Konzentration, UTP konstant) und divalenten Kationen ($MgCl_2$ und $MnCl_2$ 6 : 1 zueinander) im Verhältnis 1 : 1. Unter diesen Bedingungen weist das Enzym ein hyperbolisches Sättigungsverhalten auf (Abb.31a). Mit 1 mM divalenter Kationen im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis erhalten wir einen rascheren Anstieg der Enzymaktivität. Im Lineweaver-Burk-Diagramm ist zu erkennen, daß die Petersilie-RNA-Polymerase I der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht und im Falle von NTP und divalenten Kationen im Verhältnis 1 : 1 zueinander einen apparenten K_m-Wert von o,o442 mM aufweist (Abb.31b). Divalente Kationen, die dieses Verhältnis übersteigen ($Kation_{exc}$), erniedrigen den K_m-Wert auf o,o288 mM, während die maximale Enzymgeschwindigkeit (V_{max}) annähernd gleichbleibt. Bei einer sehr hohen konstanten Kationenkonzentration von 7 mM und ansteigender NTP-Konzentration ist es möglich, den K_m-Wert auf o,o183 mM noch weiter zu erniedrigen (Abb.31b, Inset).

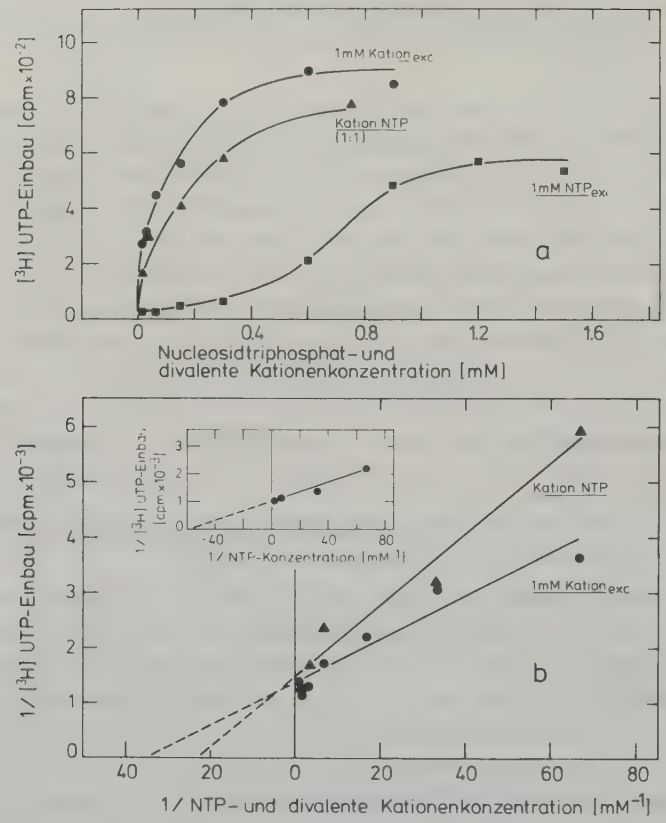

Abb.31: Einfluß der Substratkonzentration auf die Petersilien-RNA-Polymerase I.
Das Enzym wurde nach 2.5. gereinigt und nach 2.9.1. inkubiert und die RNA-Synthese bestimmt.
a.) NTP (ATP, GTP, CTP in gleicher Konzentration; 0,1 mM [^{3}H] UTP (6 µCi) konstant) und divalente Kationen ($MgCl_2$ und $MnCl_2$ 6 : 1) wurden im Verhältnis 1 : 1 variiert. ▲—▲ NTP und Kationen (1 : 1); ●—● Kationen im Überschuß ($Kation_{exc}$; 1 mM insgesamt $MgCl_2$, $MnCl_2$ im 6 : 1 Verhältnis); ■——■ NTP im Überschuß (NTP_{exc}; 1 mM insgesamt ATP, GTP, CTP).

b.) Lineweaver-Burk-Diagramm (zu a.). ▲—▲ NTP und Kationen (1 : 1); ●—● $Kation_{exc}$ (1 mM). Inset: divalente Kationen konstant (6 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$); NTP variabel.

Im Unterschied dazu führt eine NTP-Konzentration (NTP_{exc}, insgesamt ATP, GTP,CTP, 1 mM), die das 1 : 1 Verhältnis von NTP und divalenten Kationen übersteigt, zu einem sigmoiden Sättigungsverhalten der Polymerase-Aktivität (31a). Diese Sigmoidität der Enzymkinetik könnte auf ein allosterisch reguliertes Enzym hindeuten.

3.11.2. Einfluß der Substratkonzentration auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und allgemeiner fassen zu können, wurde das vorhergehende Experiment mit RNA-Polymerase I aus Sojabohne wiederholt. Der Einfluß von NTP (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration) und $MgCl_2$ im Verhältnis 1 : 1 zueinander auf die Enzymaktivität ist in Abb.32 dargestellt. Wieder kann Michaelis-Menten-Kinetik beobachtet werden mit einem apparenten K_m-Wert von o,o24 mM (Abb.32b). Im Vergleich mit RNA-Polymerase I von Petersilie liegen die mit dem Sojabohnen-Enzym erhaltenen K_m-Werte niedriger. Mit 1 mM $MgCl_2$ im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis wird der apparente K_m-Wert auf o,o11 mM erniedrigt, während der V_{max}-Wert unverändert bleibt (Abb.32a und b). Mit 1 mM NTP über das 1 : 1 Verhältnis ist wieder ein sigmoides Enzymverhalten zu beobachten (Abb.32a), was ebenfalls auf ein allosterisch reguliertes Enzym hinweist. Um diese Schlußfolgerung zu überprüfen, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem der Einfluß der NTP-Konzentration, die über dem 1 : 1 Verhältnis von NTP und $MgCl_2$ liegt, auf die Enzymaktivität untersucht wurde (Abb.33). Wie erwartet erhält man eine Schar sigmoider Kurven, die sich in ihrer Steilheit voneinander unterscheiden. Je geringer die NTP-Konzentration ist, die das 1 : 1 Verhältnis übersteigt, desto mehr nähert sich der erhaltene Kurvenverlauf der Michaelis-Menten-Kinetik an.

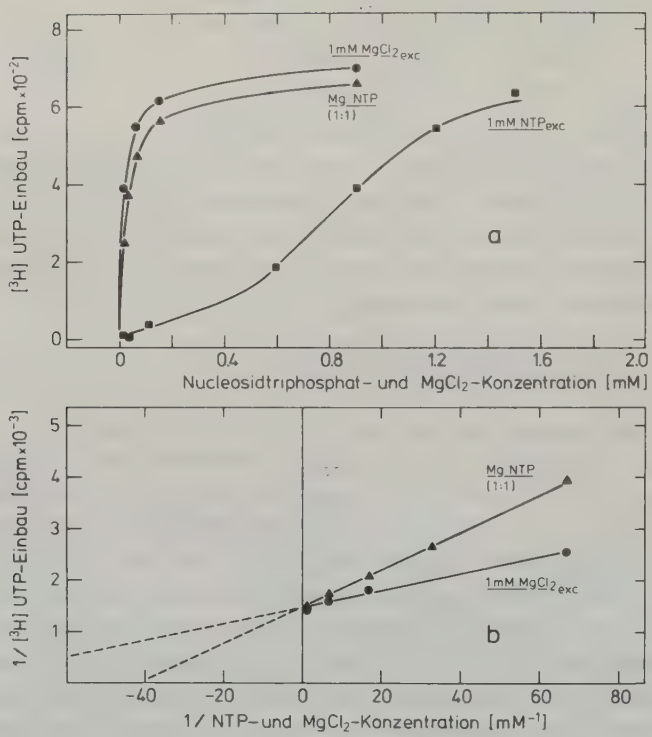

Abb.32: Einfluß der Substratkonzentration auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I.
Das Enzym wurde nach 2.6. gereinigt und nach 2.1o. inkubiert und die RNA-Synthese bestimmt.
a.) NTP (ATP, GTP, CTP in gleicher Konzentration; o,1 mM [^{3}H] UTP (6 µCi) konstant) und $MgCl_2$ wurden im Verhältnis 1 : 1 variiert. ▲—▲ NTP und $MgCl_2$ (1 : 1); ●—● $Kation_{exc}$ (1 mM $MgCl_2$); ■—■ NTP_{exc} (1 mM insgesamt ATP, GTP, CTP).
b.) Lineweaver-Burk-Diagramm (Werte von a.). ▲—▲ NTP und $MgCl_2$ (1 : 1); ●—● $Kation_{exc}$ (1 mM $MgCl_2$).

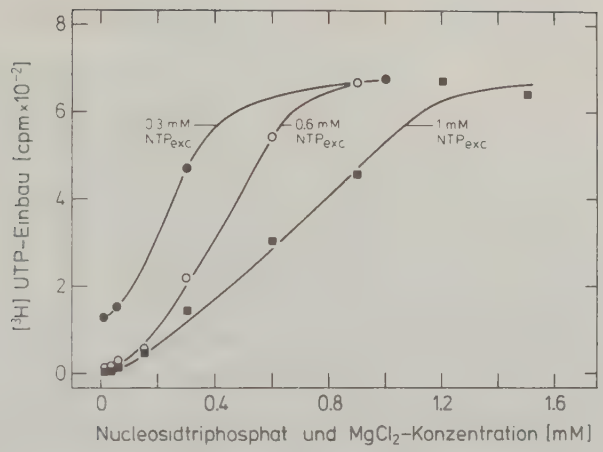

Abb.33: Einfluß von unterschiedlicher NTP-Konzentrationen im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis von NTP und $MgCl_2$ auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I. NTP (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration; o,o5 mM [^{3}H] UTP (4 µCi) konstant) und $MgCl_2$ wurden im Verhältnis 1 : 1 variiert. o,3; o,6; 1,o mM NTP waren jeweils im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis.

In Anbetracht der in 3.11.1. und 3.11.2. erhaltenen Ergebnisse sind folgende Schlußfolgerungen unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu ziehen: 1.) Das Substrat der RNA-Polymerase I ist der Komplex gebildet aus NTP und divalentem Kation. 2.) Divalente Kationen stellen notwendige Aktivatoren der RNA-Polymerase I dar. Zum einen können die NTP-Moleküle die Konzentration dieser Aktivatoren durch Komplexieren erniedrigen, zum anderen stellt der Komplex aus beiden Komponenten gerade das Substrat für die Polymerase dar. 3.) NTP im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis stellen Inhibitoren dar, die ein sigmoides Enzymverhalten bei unveränderter maximaler Enzymgeschwindigkeit bedingen, was auf

eine Allosterie hinweisen könnte.

3.11.3. Nähere Betrachtung des sigmoiden Verhaltens der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen

Im Kapitel 3.11.2. wurde festgestellt, daß eine NTP-Konzentration, die das 1 : 1 Verhältnis von NTP und divalenten Kationen übersteigt, ein sigmoides Enzymverhalten bei unverändertem V_{max}-Wert bedingt. Es wurde gefolgert, daß dieses sigmoide Enzymverhalten ein Hinweis auf eine kooperative Eigenschaft der RNA-Polymerase I darstellt. Weiter wurde gezeigt, daß sowohl die Petersilien- (3.3.1.) als auch die Sojabohnen-RNA-Polymerase I (Guilfoyle et al. 1976) aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist und somit eine Wechselwirkung dieser Untereinheiten im Bereich des Möglichen läge. Um dies näher zu untersuchen, wurde für die Daten aus 3.11.1. und 3.11.2. mit 1 mM NTP über dem 1 : 1 Verhältnis eine neue Auftragform gewählt.
Abb.34 stellt die Enzymkinetik der RNA-Polymerase I aus Petersilie und Sojabohne im Hill-Diagramm dar. Dabei gilt die Steigung der erhaltenen Geraden als Maß für eine vorliegende Kooperativität und damit als Maß für die Anzahl der Enzymuntereinheiten, die Substratmoleküle binden und in Wechselwirkung miteinander treten können. Die Kinetik der RNA-Polymerase I aus Sojabohne und Petersilie ergibt für beide Enzyme Geraden mit gleicher Steigung, die aber einen Knick aufweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß positive und negative Kooperativität nebeneinander vorliegt. Dies würde bedeuten, daß die im ersten Teil der Kurve (bis o,3 mM NTP und divalente Kationen) erhaltene gemeinsame Gerade mit der Steigung n_H=o,67 für eine negative Kooperativität spricht, das heißt die Anlagerung von Substratmolekülen an die Substratbindungsstellen der Enzymuntereinheiten erschwert wäre. Bei höheren Substratkonzentrationen tritt ein Knick im Kurvenverlauf auf und wir erhalten für beide Enzyme Geraden mit einer Steigung von n_H=4,7, was nun seinerseits für eine positive Kooperativität spricht, das heißt, daß die Anlagerung von Sub-

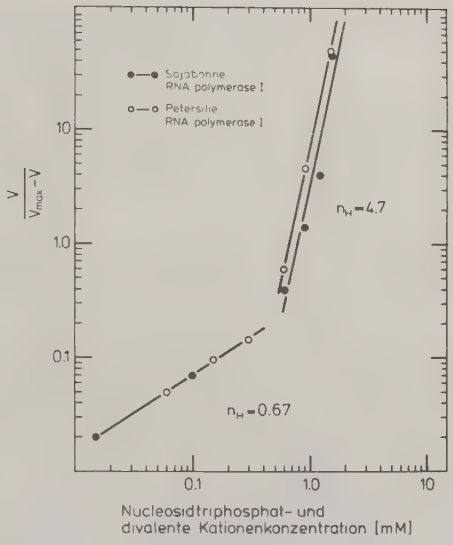

Abb.34: Hill-Diagramm der Daten aus 3.11.1. und 3.11.2. mit 1 mM NTP über dem 1 : 1 Verhältnis von NTP und divalenten Kationen.

stratmolekülen an die Substratbindungsstellen der Enzymuntereinheiten erleichtert wäre. Außerdem weist diese Steigung von n_H=4,7 darauf hin, daß in diesem Abschnitt der Kurve minimal 4 - 5 Untereinheiten bei der Substratbindung miteinander in Wechselwirkung getreten wären. Im übrigen würden wir im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik, bei der ja keine Kooperativität von Substratbindungsstellen vorliegt, eine Gerade mit einer Steigung n_H=1 erhalten. Dies tritt dann ein, wenn wir die Daten aus 3.11.1. und 3.11.2. mit NTP : Kationen im Verhältnis 1 : 1 und mit divalenten Kationen über dieses 1 : 1 Verhältnis im Hill-Diagramm auftragen (ohne Abbildung).
Die bisher erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, daß die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen ein allosterisch reguliertes Enzym darstellt. Es wurde nun versucht, wie im

Falle der Aspartattranscarbamylase (Gerhart 1970), den kooperativen Effekt der Enzymuntereinheiten durch partielle Hitzedenaturierung zu zerstören, während die katalytische Aktivität der RNA-Polymerase I erhalten bleibt. Abb.35 zeigt die in vitro-Transkription von partiell hitzedenaturierter Sojabohnen-RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

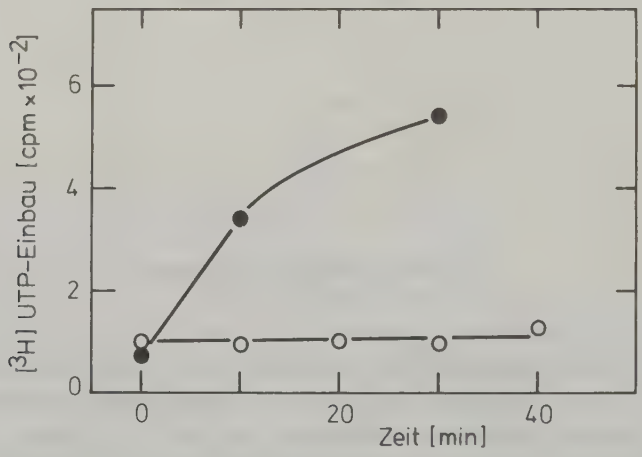

Abb.35: In vitro-Transkription von Sojabohnen-RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. ●—● Sojabohnen-RNA-Polymerase I inkubiert nach 2.1o.1. O—O Sojabohnen-RNA-Polymerase I für 3 min auf 6o°C erhitzt, danach nach 2.1o.1. inkubiert.

Man erkennt, daß durch die Hitzebehandlung das Enzym soweit geschädigt wurde, daß keine katalytische Aktivität mehr festzustellen ist und somit auch kein kooperatives Verhalten der Untereinheiten mehr studiert werden konnte.

3.11.3.1. Einfluß von CTP und ATP auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I

Bisher hatten wir uns den Einfluß der NTP-Konzentration (ATP, GTP, CTP in gleicher Konzentration) im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis von NTP und divalenten Kationen auf die Polymerase-Aktivität angesehen. Es war nun von großer Bedeutung zu wissen, ob einzelne NTP einen unterschiedlichen Einfluß auf den Verlauf der Enzym-Substrat-Beziehung ausüben. Aus diesem Grund wurde sowohl CTP als Vertreter der Pyrimidinbasen, als auch ATP als Vertreter der Purinbasen in einer Konzentration von o,3 mM über das 1 : 1 Verhältnis von NTP und $MgCl_2$ in das Inkubationsmedium gegeben. Aus Abb.36 ist zu entnehmen, daß CTP und ATP ebenfalls einen sigmoiden Kurvenverlauf zur Folge haben.

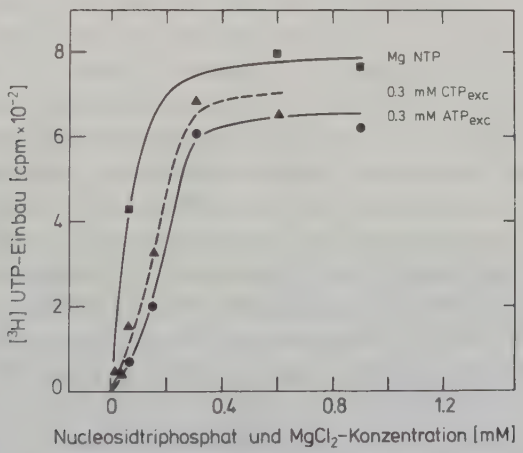

Abb.36: CTP und ATP im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis von NTP und $MgCl_2$. Inkubationsbedingungen siehe Abb.33. ■—■ NTP und $MgCl_2$ (1 : 1); ▲---▲ o,3 mM CTP im Überschuß (CTP_{exc}); ●—● o,3 mM ATP im Überschuß (ATP_{exc}).

Dabei scheint der sigmoide Verlauf durch ATP im Überschuß stärker ausgeprägt zu sein als der durch CTP verursachte.

3.11.3.2. Komplexbildung zwischen Nucleosidtriphosphat und divalentem Kation

Betrachtet man die in 3.11.2. vorgetragene Schlußfolgerung, daß divalente Kationen, die nicht durch NTP komplexiert vorliegen, notwendige Aktivatoren der RNA-Polymerase I sind, so könnte man argumentieren, daß der allosterische Effekt, der durch NTP über das 1 : 1 Verhältnis ausgelöst wird, einer Abnahme der verfügbaren freien divalenten Kationen zuzuschreiben ist. Jedoch kann eine solche Interpretation nur ungenügend den Einfluß der NTP-Konzentration im Überschuß erklären. Berechnet man auf der Basis von ATP und Mg^{2+}-Ionen den in einer Lösung vorliegenden freien und komplexierten Anteil der Ionen, so zeigt sich bei ansteigender äquimolarer Konzentration beider Ionen eine leicht hyperbolische Zunahme der freien Mg^{2+}-Ionen. Nach Morrison (1979) ergibt sich für eine Lösung von pH 8,o mit o,1 mM je Mg^{2+}- und ATP-Ionen ein $MgATP^{2-}$-Komplexanteil von 67 %. Der Anteil der freien Mg^{2+}-Ionen beläuft sich dabei auf 33 %, während derjenige der freien ATP^{4-}-Ionen 3o % beträgt bei 3 % $HATP^{3-}$. Hingegen können wir mit o,2 mM je Mg^{2+}- und ATP-Ionen in einer Lösung einen $MgATP^{2-}$-Komplexanteil von 75,5 %, 24,5 % freie Mg^{2+}-Ionen, 22,5 % ATP^{4-} und 2 % $HATP^{3-}$ errechnen. Zusammenfassend kann man feststellen, daß sowohl die Zunahme des Komplexes als auch die Zunahme der Mg^{2+}- und ATP^{4-}-Ionen nur sehr gering vom linearen Verlauf abweicht. In entsprechender Weise sieht die Zunahme der freien Mg^{2+}-Ionen bei 1 mM ATP über das 1:1 Verhältnis aus, nur daß diesmal der errechnete Anteil gegenüber der Komplexkonzentration weit geringer ist. Legt man diese Berechnung und den entsprechenden Verlauf der Mg^{2+}-Zunahme mit und ohne ATP im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis zugrunde, so müßten wir für die Polymerase-Aktivität, falls der sigmoide Effekt allein auf dem Wegfangen des Aktivators Mg^{2+}-Ionen beruht, eine Michaelis-Menten-Kinetik mit höher-

em K_m-Wert erwarten. Dies bedeutet, daß der Einfluß von NTP im Überschuß auf die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen nicht nur im Komplexieren divalenter Kationen zu suchen ist. Auch der Vergleich der errechneten Konzentrationen der freien Mg^{2+}-Ionen und der tatsächliche Effekt der NTP im Überschuß auf die Enzymaktivität untermauert die Ansicht, daß es sich bei der RNA-Polymerase I um ein allosterisch reguliertes Enzym handelt. Liegen 1 mM NTP zusätzlich zur äquimolaren Konzentration von o,2 mM NTP und $MgCl_2$ im Inkubationsmedium vor, so kann der Anteil der freien Mg^{2+}-Ionen auf 3o % des Wertes ohne zusätzliche NTP errechnet werden (Storer und Cornish-Bowden 1976). Die Polymerase-Aktivität unter identischen Bedingungen beläuft sich aber nur auf 1o % (Abb.37). Aus Abb.37 kann weiterhin entnommen werden, daß NDP die in vitro-Transkription nur gering beeinträchtigt, während AMPPCP und dGTP hemmend wirken.

In diesem Zusammenhang schien es geboten, ein zusätzliches Experiment mit dem Komplexbildner EDTA durchzuführen (Abb.38). In diesem Fall erkennt man, daß die RNA-Polymerase I keinerlei Syntheseaktivität zeigt, wenn die NTP- und divalente Kationenkonzentration nicht die des EDTA übersteigt. Nimmt die NTP- und divalente Kationenkonzentration hingegen über die des EDTA zu, so beschreibt die Polymerase wieder eine Sättigungskurve. Dieses Ergebnis läßt sich damit erklären, daß EDTA stabilere Komplexe mit divalenten Kationen eingeht als es die NTP-Ionen können (Bjerrum et al. 1958) und so divalente Kationen weder als Aktivatoren noch zur Bildung des Substrats der RNA-Polymerase I zur Verfügung stehen.

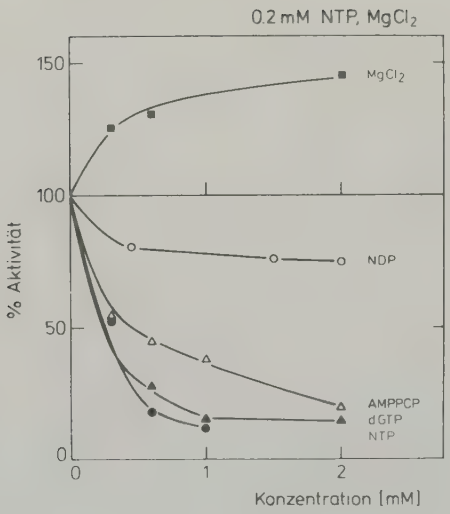

Abb.37: Einfluß verschiedener Substanzen auf die Sojabohnen-RNA-Polymerase I.
Sojabohnen-RNA-Polymerase I wurde nach 2.1o.1. mit o,2 mM je NTP und $MgCl_2$ inkubiert und die erhaltene Polymerase-Aktivität 1oo % gesetzt. Folgende Substanzen sind in ansteigender Konzentration zusätzlich im Inkubationsmedium: ■—■ $MgCl_2$; O—O NDP (ADP, CDP, GDP in gleicher Konzentration); △—△ AMPPCP; ▲—▲ dGTP; ●—● NTP (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration).

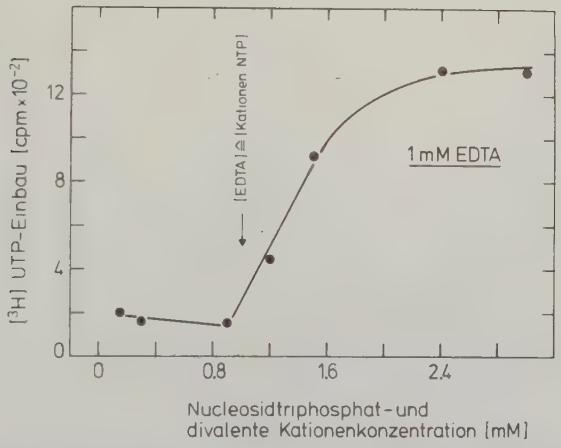

Abb.38: Effekt von EDTA auf die Petersilien-RNA-Polymerase I. 1 mM EDTA war zusätzlich im Inkubationsmedium (2.9.1.). NTP (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration; o,1 mM [^{3}H] UTP (8 µCi) konstant) und divalente Kationen ($MgCl_2$ und $MnCl_2$, 6 : 1) waren im Verhältnis 1 : 1 variabel.

3.11.3.3. Einfluß von Nucleosiddiphosphat und Orthophosphat anstelle von NTP_{exc} auf die RNA-Polymerase I-Aktivität höherer Pflanzen

Die Frage warf sich nun auf, welchen Einfluß 1 mM NDP (ADP, CDP, GDP in gleicher Konzentration) und 1 mM Orthophosphat gleichzeitig im Inkubationsmedium anstelle von 1 mM NTP über das 1 : 1 Verhältnis (NTP_{exc}) auf die in vitro-Transkription der Polymerasen ausüben. In diesem Versuch konnte aufgezeigt werden, daß sowohl die Petersilien- als auch die Sojabohnen-RNA-Polymerase I wieder der hyperbolischen Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht mit den apparenten K_m-Werten von o,o77 (Petersilie, Abb.39) und o,o45 mM (Sojabohne, Abb.4o).

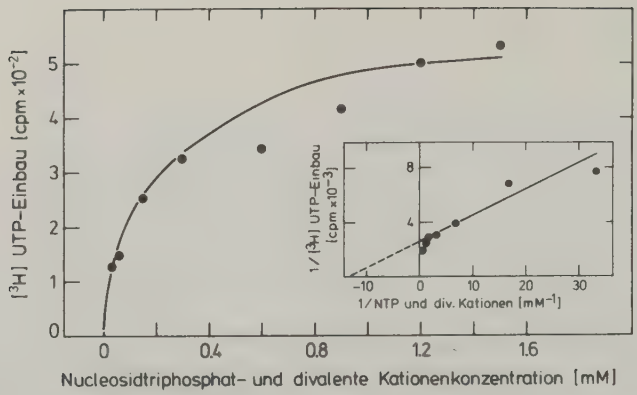

Abb.39: Enzymkinetik der Petersilien-RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von NDP und P_i. NTP und divalente Kationen ($MgCl_2$ und $MnCl_2$, 6 : 1) waren im Verhältnis 1 : 1 variabel (siehe Abb.31). 1 mM NDP (ADP,CDP, GDP in gleicher Konzentration) und 1 mM Na_3PO_4 war zusätzlich im Inkubationsmedium. Inset: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Da einerseits NTP_{exc} ein allosterisches Verhalten der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen bedingt, während andererseits NDP und Orthophosphat die Michaelis-Menten-Beziehung der Enzymkinetik aufrechterhalten, lag es nahe die Schlußfolgerung zu ziehen, daß ein enzymatischer Abbau von NTP zu NDP und P_i teilweise den hemmenden Effekt der NTP_{exc} auf die RNA-Synthese verhindert. Tatsächlich fanden wir in isolierten Petersilie-Zellkernen eine sehr hohe NTPase-Aktivität (siehe 3.7.).

3.11.4. Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne

In einer Reihe von Experimenten wurde nun die NTPase-Aktivität isolierter Zellkerne in Abhängigkeit von NTP und divalenten Kationen untersucht.

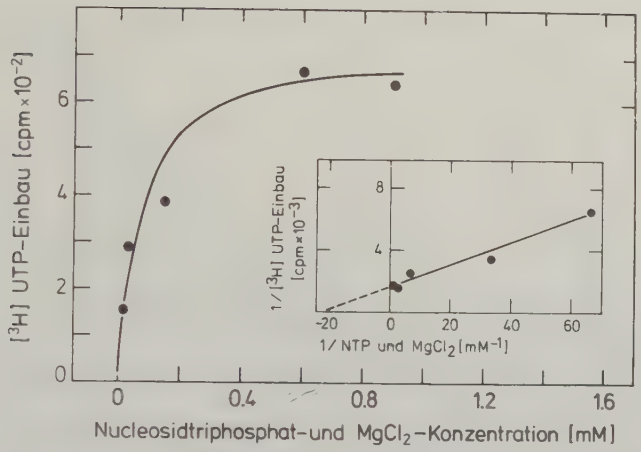

Abb.4o: Enzymkinetik der Sojabohnen-RNA-Polymerase I in Abhängigkeit von NDP und P_i. NTP und $MgCl_2$ waren im Verhältnis 1 : 1 variabel (siehe Abb.32). 1 mM NDP (ADP,CDP,GDP in gleicher Konzentration) und 1 mM Na_3PO_4 waren zusätzlich im Inkubationsmedium. Inset: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Abb.41 zeigt die NTPase-Aktivität in Abhängigkeit von variabler ATP-Konzentration im Bereich von 1 - 2o mM bei verschiedenen konstanten $MgCl_2$-Konzentrationen. Aus diesen Lineweaver-Burk-Plots folgt, daß mit ansteigender $MgCl_2$-Konzentration die Michaelis-Menten-Konstante der NTPase-Aktivität ebenfalls zunimmt, während die maximale Enzymgeschwindigkeit jeweils gleichbleibt (Tabelle 3). Bei einer geringen $MgCl_2$-Konzentration von o,1 mM kann jedoch festgestellt werden, daß einem sehr niedrigen K_m-Wert eine - ebenfalls niedrige maximale Enzymgeschwindigkeit gegenübersteht. Dies spricht dafür, daß der Komplex aus ATP und Mg^{2+}-Ion das Substrat für die NTPase darstellt und somit bei sehr geringer $MgCl_2$-Konzentration nicht genügend Substrat zur Verfügung steht.

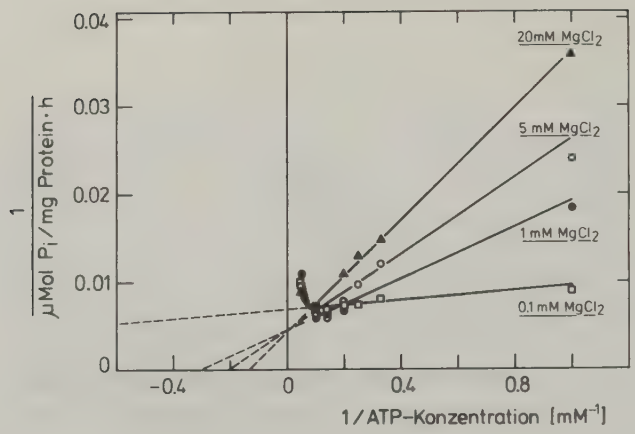

Abb.41: Einfluß von $MgCl_2$ auf die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne. Lineweaver-Burk-Plots sind dargestellt. Die ATP-Konzentration wurde von 1 - 2o mM variiert bei verschiedenen konstanten $MgCl_2$-Konzentrationen. Die Enzymaktivität wurde nach 2.15. bestimmt.

Mg^{2+} (mM)	K_m (mM)	V (µMol P_i x mg^{-1}Protein x h^{-1})
o,1	o,371	147,3
1	3,344	241,5
5	4,97o	243,9
2o	8,26o	255,1

Tabelle 3: Einfluß von $MgCl_2$ auf die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne. Enzymkinetische Daten aus Abb.41.

Ein weiteres Experiment soll die NTPase-Aktivität in Abhängigkeit von ansteigender ATP- und $MgCl_2$-Konzentration im Verhältnis 1 : 1 untersuchen (Abb.42; Tabelle 4). Die dargestellten Lineweaver-Burk-Plots führen zu folgenden Ergebnissen: 1.) Der Komplex gebildet aus ATP- und Mg^{2+}-Ion scheint das Substrat der NTPase zu sein. Für beide Komponenten im Verhältnis 1 : 1 zueinander läßt sich ein K_m-Wert von 2,57 mM angeben. Bei einer Konzentration über 1o mM beider Ionen tritt Substrathemmung ein. 2.) Mg^{2+}-Ionen, die das 1 : 1 Verhältnis übersteigen, scheinen als apparente kompetitive Inhibitoren zu fungieren. Bei 1 mM $MgCl_{2exc}$ ergibt sich ein K_m-Wert von 3,53 mM. 3.) Liegen dagegen ATP-Ionen über dem 1 : 1 Verhältnis im Inkubationsmedium vor (ATP_{exc}), so stellen dies Aktivatoren der NTPase dar. Mit 1 mM ATP_{exc} stellt sich ein K_m-Wert von o,o288 mM ein. Erhöht man die im Überschuß befindliche ATP-Konzentration noch weiter, führt dies zu keiner Veränderung der Enzymkinetik. Ebenfalls ersichtlich ist, daß wie auch mit $MgCl_2$ im Überschuß die maximale Enzymgeschwindigkeit nicht verändert wird. 1 mM AMPPCP (ß-γ-methylen AMP) zusätzlich zu den äquimolaren Konzentrationen von ATP und $MgCl_2$ im Inkubationsmedium resultiert in einem K_m-Wert von o,529 mM, was auf eine Abnahme der hemmenden Mg^{2+}-Ionen schließen läßt. AMPPCP ist eine dem ATP analoge Substanz, die zwischen der ß-γ-Position ihrer Phosphatanionen durch eine NTPase nicht hydrolysiert werden kann, die aber ähnliche Komplexierungseigenschaften wie ATP aufweist.

3.12. Einfluß der Substratkonzentration auf die Escherichia coli-RNA-Polymerase

Im Falle der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen wurde im Kapitel 3.11. aufgezeigt, daß dieses Enzym allosterisch reguliert werden kann. Es ergab sich nun die Frage, ob die Kooperativität der Polymeraseuntereinheiten ein für die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen spezifisches Merkmal darstellt, oder ob die RNA-Polymerase der Prokaryonten ebenfalls eine Wechselwirkung ihrer Untereinheiten aufweist.

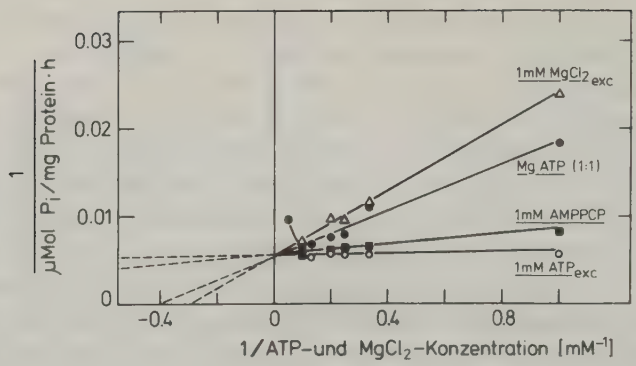

Abb.42: Einfluß von $MgCl_2$ und ATP auf die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne. Lineweaver-Burk-Plots sind dargestellt. ATP und $MgCl_2$ wurden im Verhältnis 1 : 1 variiert. ●—● $MgCl_2$ und ATP (1 : 1); Δ—Δ 1 mM $MgCl_{2exc}$; ■—■ 1 mM AMPPCP; O—O 1 mM ATP_{exc}.

Bedingungen	K_m (mM)	V (uMol P_i x mg^{-1}Protein x h^{-1})
ATP Mg (1:1)	2,57	191,5
+ 1 mM ATP_{exc}	o,o288	178,3
+ 1 mM Mg^{2+}_{exc}	3,53	189,4
+ 1 mM AMPPCP	o,529	182,5

Tabelle 4: Einfluß von $MgCl_2$ und ATP auf die NTPase-Aktivität. Enzymkinetische Daten aus Abb.42.

Aus diesem Grunde wurde die E.coli-RNA-Polymerase-Aktivität in Abhängigkeit von ansteigender NTP-Konzentration (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration; o,o5 mM [^{3}H] UTP (4 µCi) konstant) und $MgCl_2$ im Verhältnis 1 : 1 untersucht.
Abb.43 zeigt die Auswertung enzymkinetischer Daten im Experiment mit 1 mM NTP über dem 1 : 1 Verhältnis, an Hand der Auftragung im Diagramm $V_oV_s[S]$, Lineweaver-Burk-Diagramm und Hill-Diagramm auf.
Man erkennt, daß die E.coli-RNA-Polymerase, auf Grund des sigmoiden Verlaufs im Diagramm $V_oV_s[S]$, der abknickenden Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm und der Steigung von n_H=1,77 im Hill-Diagramm, eine positive Kooperativität ihrer Untereinheiten aufweisen müßte. Die erhaltene Steigung der Geraden im Hill-Diagramm weist im übrigen darauf hin, daß eine Wechselwirkung von minimal 2 Substratbindungsstellen vorliegen könnte.

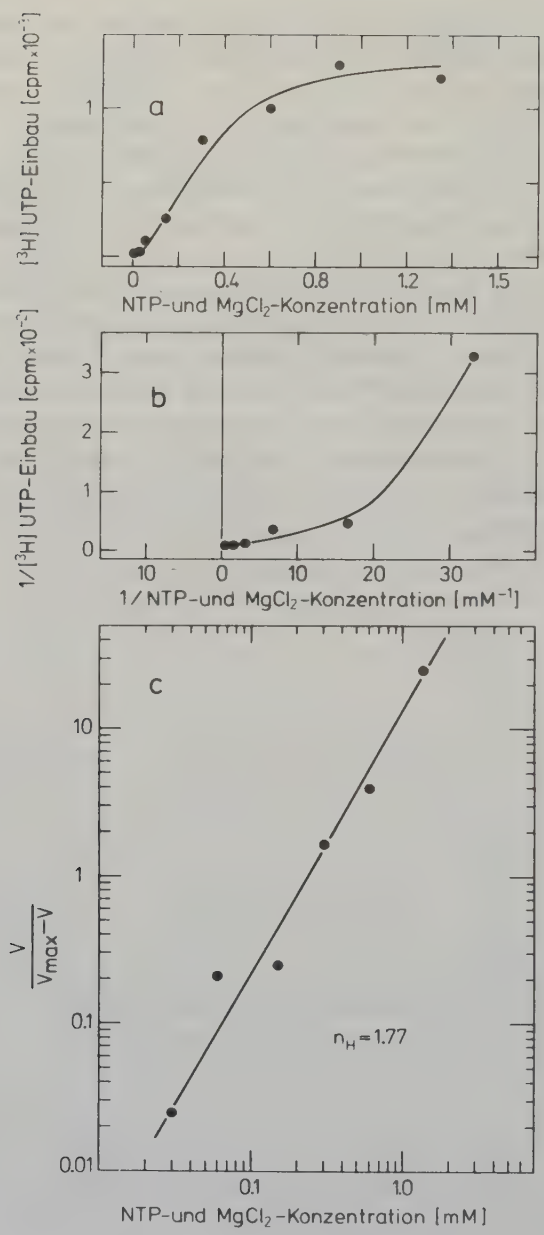
a
[³H] UTP-Einbau [cpm×10⁻³]
1
0
0.4
0.8
1.2
1.5
NTP-und MgCl₂-Konzentration [mM]
b
1/[³H] UTP-Einbau [cpm×10⁻³]
3
2
1
0
10
0
10
20
30
1/NTP-und MgCl₂-Konzentration [mM⁻¹]
c
V / Vmax−V
10
1
0.1
0.01
nH=1.77
0.1
1.0
NTP-und MgCl₂-Konzentration [mM]

Abb.43: Einfluß der Substratkonzentration auf die E.coli-RNA-Polymerase.
NTP (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration; o,o5 mM $[^3H]$ UTP (4 µCi) konstant) und $MgCl_2$ wurden in äquimolarer Konzentration variiert. 1 mM NTP (ATP, CTP, GTP in gleicher Konzentration) war über das 1 : 1 Verhältnis im Inkubationsmedium. Die in vitro-Transkription wurde nach 2.11.1. bestimmt.
a.) Diagramm $V_o V_s [S]$.
b.) Lineweaver-Burk-Diagramm der Daten aus a.
c.) Hill-Diagramm der Daten aus a.

4. Diskussion

Während bei den Prokaryonten ein Enzym für den Vorgang der Transkription verantwortlich zeichnet, weisen eukaryontische Zellen eine multiple Anzahl DNA-abhängiger RNA-Polymerasen auf, die unterschiedliche Syntheseaufgaben verrichten und sich biochemisch auf Grund von Ionenbedarf, α-Amanitin-Sensitivität, Eluationsprofil auf Ionenaustauschern und Untereinheitenstruktur in drei Hauptklassen einteilen lassen (Roeder und Rutter 1969).

Jede dieser drei Klassen kann mit Hilfe der Gelelektrophorese sowohl unter denaturierenden, als auch nicht-denaturierenden Bedingungen in zwei oder drei Arten unterteilt werden. RNA-Polymerase I (oder A) ist im Nucleolus lokalisiert (Lin et al. 1975), transkribiert die ribosomalen DNA-Cistrons (Gurley et al. 1976) und erweist sich gegenüber dem Pilztoxin α-Amanitin als insensitiv (Lindell et al. 1970). RNA-Polymerase II (oder B) hingegen ist im Nucleoplasma zu finden, sie synthetisiert die HnRNA und mRNA (Zylber und Penman 1971) und wird durch 10^{-8}-10^{-9} M α-Amanitin gehemmt (Lindell et al. 1970). RNA-Polymerase III (oder C) ist ebenfalls im Nucleoplasma und möglicherweise auch im Cytoplasma lokalisiert, sie ist zuständig für die Synthese der 5 S rRNA und tRNA und wird erst durch höhere α-Amanitin Konzentrationen gehemmt (Schwartz et al. 1974).

Während es bei tierischen Objekten und bei niederen Eukaryonten (Hefe, Physarum etc.) schon öfter gelungen ist, die drei Polymeraseklassen nachzuweisen und die zugehörigen Enzyme zu isolieren, findet man in der Literatur weit weniger Angaben über diese Enzyme aus höheren Pflanzen (siehe auch die Zusammenfassungen von Biswas et al. 1975, Chambon 1975 und Duda 1976). So wundert es auch nicht, daß das Wissen über die eukaryontischen RNA-Polymerasen hauptsächlich auf Untersuchungen an tierischen Objekten und niederen Eukaryonten basiert. Was die höheren Pflanzen anbetrifft, so ist bewiesen, daß sie ebenfalls eine multiple Anzahl RNA-Polymerasen besitzen, von denen die RNA-Polymerasen I und II ähnliche Eigenschaften wie die anderen

eukaryontischen RNA-Polymerasen aufweisen (siehe Duda 1976). RNA-Polymerase II konnte schon aus einigen Geweben höherer Pflanzen isoliert werden, zu nennen wären Mais (Mullinix et al. 1973), Petersilie-Suspensionszellen (Link und Richter 1975), Weizenembryonen (Jendrisak und Burgess 1976) und Sojabohne (Guilfoyle und Key 1977), während dies im Fall der RNA-Polymerase III nur einmal zufriedenstellend gelungen ist (Jendrisak 1979). Erwähnt werden sollte in diesem Zusammenhang die geglückte Isolierung aller drei RNA-Polymerasen aus Weizenembryonen (Jendrisak 1979). Die Enzyme wurden zuerst über mehrere Chromatographie-Schritte gemeinsam angereinigt, anschließend durch eine DEAE-Sephadex-Chromatographie voneinander getrennt, wobei die RNA-Polymerasen I, II und III nacheinander bei o,1 M, o,2 M und o,25 M Ammoniumsulfat eluiert werden und die Anteile der Polymerasen an der gesamten extrahierbaren Aktivität jeweils 7, 9o und 3 % betrugen. Es erwies sich, daß RNA-Polymerase I wie erwartet α-Amanitin insensitiv war (getestet bis 1 mg/ml), RNA-Polymerase II durch o,o5 µg/ml α-Amanitin zu 5o % gehemmt wurde und für RNA-Polymerase III eine Konzentration von 5 µg/ml notwendig war um 5o % Inhibition zu erreichen.

4.1. DNA-abhängige RNA-Polymerase I höherer Pflanzen

Wie schon erwähnt, ist die RNA-Polymerase I im Zellkern für die Synthese der ribosomalen RNA zuständig und somit maßgeblich am Aufbau der Ribosomen beteiligt. Das für den Stoffwechsel sehr entscheidende Enzym konnte bisher aus einer Reihe von tierischen Objekten, zu nennen wäre Kalbsthymus, Maus-Myeloma und Rattenleber (siehe Chambon 1975), aber auch aus einigen niederen Eukaryonten wie Physarum polycephalum (Burgess und Burgess 1974), Mucor rouxii (Young und Whiteley 1975) und Hefe gewonnen werden. Bei höheren Pflanzen jedoch gelang eine zufriedenstellende Reinigung dieses Enzyms nur in wenigen Fällen, anzuführen wären 2,4 D-behandeltes Sojahypokotyl (Guilfoyle et al. 1976), Blumenkohl (Guilfoyle 1976) und Weizenembryonen (Jendrisak 1979). Auch Suspensionszellen einer Wurzelkalluskultur der Peter-

silie bieten eine gute Quelle für die Reinigung der RNA-Polymerase I, da sie über Schüttelkultur und Fermentation in unbegrenzter Menge angezogen werden können (Großmann et al. 1980). Im Gegensatz zur Methode von Link und Richter (1975), bei der nur die Petersilien-RNA-Polymerase II intakt erhalten werden konnte, lag der Beginn des hier beschriebenen Verfahrens zur Reinigung der RNA-Polymerase I aus Petersilie, gemäß Guilfoyle et al.(1976), in der Isolierung von Chromatin.
Dieses wurde bei einem pH-Wert von 8,0 isoliert und enthielt den größten Teil des nucleolaren Enzyms in gebundener Form, wobei die RNA-Polymerase II im Überstand nachgewiesen werden konnte. Während der gesamten Reinigungsprozedur wurde darauf geachtet, daß die RNA-Polymerase I in konzentrierter Form in Gegenwart von hoher Ionenstärke und hoher DTT-Konzentration stabilisiert wurde. Als sehr wirkungsvoller Reinigungsschritt erwies sich die Aufarbeitung des Präparats mit DEAE-Cellulose und Phosphocellulose im "Batch"-Verfahren, da es sich zum einen um eine Methode handelt, die nur sehr wenig Zeit in Anspruch nimmt und durch die eine übermäßige Verdünnung des Enzympräparats vermieden werden kann und zum anderen ein Großteil unspezifischer Proteine entfernt. Dieser Prozedur schlossen sich Ionenaustauschchromatographie auf einer Phosphocellulose-, DEAE-Cellulose und einer weiteren Phosphocellulose-Säule an. Die Enzymaktivität konnte jeweils durch 0,1 M Ammoniumsulfat eluiert werden und erwies sich gegenüber α-Amanitin (100 µg/ml) als insensitiv. Die gereinigte Petersilien-RNA-Polymerase I ergab bei der elektrophoretischen Auftrennung eine Untereinheiten-Struktur, die den Enzymen aus Sojabohnen (Guilfoyle et al. 1976) und Blumenkohl (Guilfoyle 1976) ähnlich war. Dieser Befund fand seine weitere Bestätigung, indem man sich den Ionenbedarf des gereinigten Enzyms anschaut.
Neben der Ionenstärke, dem Eluationsprofil auf Ionenaustauschern, der α-Amanitin-Sensitivität, der Struktur der Untereinheiten und der Aufgabenstellung ist die Abhängigkeit von Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen ein weiteres Kriterium für die Klassi-

fizierung der RNA-Polymerasen. So spricht die erhaltene maximale Enzymaktivität bei 1 mM $MnCl_2$ oder 4 - 6 mM $MgCl_2$ bei einer Ionenstärke von 1o - 2o mM Ammoniumsulfat im Inkubationsmedium für die RNA-Polymerase I. Die erhaltenen Daten für Ionenbedarf und Ionenstärke der Sojabohnen-RNA-Polymerase I lassen sich gut mit den oben aufgeführten Werten für die Petersilien-RNA-Polymerase I vergleichen.
Die Fragen aber, die sich dabei unwillkürlich stellen, beziehen sich auf die in vitro-Bedingungen einer solchen RNA-Synthese mit einem zuvor gereinigten Enzym. Deshalb bleibt zu untersuchen, ob die Polymerase überhaupt in vitro an eine DNA-Matrize bindet, wie spezifisch eine solche Bindung ist, welche Transkriptionsprodukte erhalten werden und welche weiteren Einflüsse von der Konzentration der Substratmoleküle und Metallionen auf den Vorgang der in vitro-Transkription ausgehen.
Mit Hilfe der Spreitungstechnik war es möglich, die Bindung der gereinigten Petersilien-RNA-Polymerase I an eine DNA-Matrize elektronenmikroskopisch nachzuweisen. Die nur unzureichende Auflösung der Aufnahme ließ jedoch eine Aussage über die RNA-Synthese nicht zu. Untersucht man elektrophoretisch die in vitro-Transkriptionsprodukte der gereinigten Petersilien-RNA-Polymerase I mit isolierter DNA aus Petersiliewurzeln als Matrize, so ist deutlich zu erkennen, daß bevorzugt RNA mit einem Molekulargewicht von 29 S synthetisiert wird. Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit dem, erhalten bei der in vitro-Transkription mit isolierten Petersilie-Zellkernen, ergibt eine Übereinstimmung im Molekulargewicht der hochmolekularen Produkte.
Die Frage, ob es sich dabei um eine gemeinsame Vorstufe der reifen ribosomalen RNA-Moleküle handelt, kann vom Molekulargewicht der Syntheseprodukte her bejaht werden (siehe Seitz und Seitz 1979). Würde dieses Ergebnis bedeuten, daß die Polymerase in vitro spezifisch an die Promotorregion der ribosomalen DNA-Cistrons bindet, so könnte man sich ein Verfahren vorstellen, das mit Hilfe von an Sepharose gekoppelter Plasmid-DNA, die die rDNA-Cistrons als "Insert" enthält,

eine Reinigung und Auftrennung der RNA-Polymerase I möglich macht.
Bei einem Versuch mit Sojabohnen-RNA-Polymerase I und einer Sepharose-Säule, die die Sojabohnen-rDNA-Cistrons gebunden enthielt, traten bei der Eluation distinkte Enzymaktivitäts-Peaks auf, die auf eine spezifische Bindung schließen lassen.

4.1.1. Einfluß von Pflanzenhormonen

Bei tierischen Hormonen wurden bisher zwei Wirkungsmechanismen ernsthaft diskutiert. Bei dem einen treten die Hormone (z.B. verschiedene Peptidhormone) mit Rezeptoren der Zellmembran in Wechselwirkung und führen über membrangebundene Nucleotid-Cyclasen zur Bildung von 3', 5'-Purinnucleotiden (cAMP; cGMP), welche dann als "second messenger" intrazelluläre Folgereaktionen auslösen (Sutherland 1972).
Bei dem anderen Prinzip, das bei den verschiedenen Steroidhormonen wirksam ist, tritt das Hormon in die Zelle ein und wird im Cytoplasma von einem spezifischen Rezeptorprotein gebunden. Dieser Steroid-Protein-Komplex erfährt im Cytoplasma eine "Transformation" und ist nun in der Lage in den Zellkern einzuwandern, mit dem DNP in Wechselwirkung zu treten und eine RNA-Neusynthese zu induzieren (O'Malley und Means 1974). In einer Reihe von Untersuchungen wird aber auch über eine Aktivitätssteigerung der RNA-Polymerase berichtet (Dierks-Ventling und Bieri-Bonniot 1976).
Auch pflanzliche Gewebe enthalten kleine, wenig hydrophile Moleküle, deren Struktur, wie im Falle der Gibberelline, den Steroidhormonen ähnlich ist und die eine Vielzahl von Vorgängen in der Pflanze beeinflussen. In Analogie zu den tierischen Hormonen bezeichnet man sie als Phytohormone, da sie in geringen Konzentrationen physiologisch wirksam werden und für das Wachstum und die Steuerung von Differenzierungsvorgängen in der Pflanze unerlässlich sind. Jedoch steht bisher einer Fülle beschriebener Hormonwirkungen eine weitgehende Unkenntnis über den molekularen Wirkungsmechanismus dieser Stoffe gegenüber. Als unbestritten gilt, daß Auxin die nucleäre Funktion verändern kann und in vielen pflanz-

lichen Geweben die Synthese von rRNA beschleunigt. Guilfoyle et al. (1975) zeigten, daß bei Sojabohnen-Hypokotylen, die mit 2,4 D behandelt wurden, die Zunahme der RNA-Synthese von einer starken Aktivitätssteigerung der RNA-Polymerase I begleitet ist (eine Zusammenfassung bieten Kende und Gardner 1976, Jakobsen 1977).
Ob Phytohormone einen direkten Einfluß auf die RNA-Polymerasen ausüben können, sollte ein Versuch zeigen, bei dem die in vitro-Transkription von isolierter Petersilien-RNA-Polymerase I unter verschiedenen Konzentrationen dieser Hormone bestimmt wurde. Dabei stellte sich weder mit GA_3 noch mit IES ein Effekt auf die Polymerase-Aktivität ein. Auch mit cAMP, dem "second messenger" der tierischen Peptidhormone, konnte keine Beeinflussung der RNA-Polymerase I nachgewiesen werden.

4.1.2. Einfluß der Substratkonzentration

Im Zusammenhang mit der Hormonwirkung und einer Regulation der RNA-Polymerase innerhalb des Zellkerns wurden bisher mehrere Möglichkeiten diskutiert:

1.) Modifikation des DNA-Templates und die daraus resultierende Änderung in der Interaktion der RNA-Polymerase mit bestimmten Genen.
2.) Änderung der Enzymkonzentration über Neusynthese und Abbau.
3.) Modifikationen am Enzym, die die RNA-Polymerase-Aktivität oder die Affinität für bestimmte Gene beeinflussen.

Bisher wurde verschiedentlich in der Literatur von Proteinfaktoren berichtet, die sowohl aus tierischem Gewebe (Biswas et al. 1975) als auch aus Pflanzen (Duda 1976) erhalten wurden und die die RNA-Polymerase-Aktivität beeinflussen sollen. So wurde von Kuehn et al. (1979) ein nucleolares Phosphoprotein aus Zellkernen von Physarum polycephalum isoliert, das an die rDNA-Cistrons bindet und die rRNA-Synthese 5-fach stimuliert. Entfernt man von diesem Protein die Phosphatgruppen, kann keine rDNA-Bindung und keine Stimulation der Transkription mehr festgestellt werden. Auf diese

Weise könnte eine Proteinkinase-Aktivität eine regulatorische Funktion bei der rRNA-Synthese übernehmen.
Sieht man von solchen Proteinfaktoren ab, die zum einen die RNA-Polymerase, zum anderen das Template beeinflussen, so wurde bisher noch nicht in Erwägung gezogen, ob eine Regulation der RNA-Polymerasen nicht auch vom Substratangebot her und damit von der Nucleosidtriphosphat-Konzentration in Beziehung mit den divalenten Kationen vorstellbar sei.

Aus diesem Grunde wurde in einer Reihe von Versuchen der Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die in vitro-Transkription getestet. Es erwies sich dabei, daß die Petersilien-RNA-Polymerase I in einem Konzentrationsbereich von 4 - 11 mM NTP und divalenter Kationen im Verhältnis 1 : 1 zueinander keine Aktivitätsänderung zeigt. Bei NTP-Konzentrationen, die das 1 : 1 Verhältnis übersteigen, wurde die Enzymaktivität erniedrigt, waren divalente Kationen im Überschuß wurde die RNA-Polymerase stimuliert (Großmann et al. 1980).

4.2. Petersilie-Zellkerne

Um die Funktion und Wirkweise eines Enzyms zu studieren, sollte man neben den in vitro-Versuchen auch die Umgebung des Enzyms in der Zelle im Auge behalten. Bei den Eukaryonten ergibt sich im Gegensatz zu den Prokaryonten eine strenge Kompartimentierung zwischen Zellkern und Cytoplasma und somit die räumliche Trennung von Transkription und Translation. Um nun über die Substratabhängigkeit der RNA-Polymerase I weitere Aussage treffen zu können, ist es notwendig, sich im Zellkern über die Ionenverhältnisse und Enzyme, die diese verändern, einen Einblick zu verschaffen. Stärk et al. (1978) konnten bei Rattenleber-Zellkernen, die in nicht-wässrigem Medium isoliert wurden, zeigen, daß unter allen gewählten Versuchsbedingungen praktisch identische Konzentrationen von Nucleotiden im Zellkern und Cytoplasma gemessen werden konnte. Nach einem Formiat-Puls ergaben sich für die spezifischen Radioaktivitäten ebenfalls Gleichgewichtsbedingungen für purinhaltige Nucleotide zwischen Zell-

kern und Cytoplasma. Dies weist ganz deutlich darauf hin, daß kein Konzentrationsgradient für Nucleotide in der Zelle vorliegt. Bestimmt man im übrigen die ATP-Konzentration in der Zelle, so erhält man für Neurospora einen Wert von bis zu 4 mM (Gradmann und Slayman 1975). Hingegen wird eine Bestimmung der Konzentration divalenter Kationen im Zellkern dadurch erschwert, daß man nicht zwischen gebundenen und freien Ionen unterscheiden kann.
Petersilie-Zellkerne, die mit einem wässrigen Medium isoliert wurden, enthalten keine Nucleotide (nachgewiesen mit Luciferase-Test) und nur wenig anorganisches Orthophosphat (nachgewiesen nach 2.15.). Inkubiert man sie mit NTP als Substrat und mißt die Freisetzung von Orthophosphat, so stellt man fest, daß sie eine sehr hohe NTPase-Aktivität aufweisen. Es werden dabei alle 4 NTP (ATP, GTP, CTP, UTP) in Gegenwart von divalenten Kationen und auch die Diphosphate mit Ausnahme von ADP enzymatisch gespalten. Eine Aussage über die Anzahl dieser NTPasen im Zellkern kann nicht gemacht werden, obwohl zwei pH-Optima bei 5,5 und 7 auf mindestens zwei Enzyme hindeuten. Weder mit den Hemmstoffen Oligomycin, Ouabain und Actinomycin noch mit Phytohormonen, wie IES oder 2,4 D konnte eine Beeinflussung dieser NTPase-Aktivität erzielt werden. Das Ausbleiben eines Phytohormoneffekts kann aber auch darauf begründet sein, daß niedermolekulare Rezeptorproteine während der Isolierungsprozedur aus dem Zellkern ausgeschwemmt werden. Auch gereinigtes Petersilie-Chromatin wies eine sehr hohe NTPase-Aktivität auf, was darauf schließen läßt, daß wir es mit einer chromatingebundenen Enzymaktivität zu tun haben.
Als erste konnten Fischer et al. (1959) bei isolierten Zellkernen aus Schweinenieren zwei ATPasen mit verschiedenen pH-Optima aufzeigen, von denen die eine im Nucleolus, die andere im Nucleoplasma lokalisiert sein soll. Später konnten bei den verschiedensten tierischen und pflanzlichen Objekten im Zellkern NTPase-Aktivitäten nachgewiesen werden (Siebert 1963, Coleman 1965). Histochemische Untersuchungen mit Hilfe des Elektronenmikroskops bestärkten die Auffassung, daß der

Nucleolus und das Nucleoplasma die Wirkorte dieser NTPasen darstellen (Vorbrodt 1974), daß aber auch die Kernmembran als ein weiterer Sitz für eine NTPase gesehen werden muß (Shifrin und Levine 1968, Philipp et al. 1976, Agutter et al. 1976).
Fragt man sich nach der Funktion dieser NTPasen im Zellkern, so kann keine eindeutige Antwort gegeben werden. Fest steht, daß keine Analogie mit der ATPase des Muskelgewebes oder der Mitochondrien festgestellt werden kann (Siebert 1963). Siebert (1963, 1968) hält es für möglich, daß diese Enzyme mit der Kontrolle der Vorstufen-Pools für die Nucleinsäuresynthese betraut sind. Zimmerman (1977) hingegen beschreibt einen Zusammenhang zwischen der Chromosomenbewegung während der Mitose und einer NTPase-Aktivität. Tatsächlich wurde bei Bakterien ein Enzym gefunden, die DNA-Gyrase, das unter ATP-Spaltung am Windungsprozeß der DNA beteiligt ist (Wackernagl 1978). Love et al. (1969) sehen vielmehr die Aufgabe der NTPase darin, den Orthophosphat-Pool im Zellkern aufrechtzuerhalten. Untersuchungen von Agutter et al. (1976) ergaben, daß bei Kernen aus Fibroblastenzellen eine NTPase, die in den Kernporenkomplexen lokalisiert sein soll (Franke, 1974), eine wesentliche Komponente bei der nucleoplasmatischen Translokation von Ribonucleoprotein darstellt. Dabei hat sich gezeigt, daß der Transport synthetisierter RNA mit dieser NTPase-Aktivität, die als Substrat den Komplex aus divalentem Kation und NTP benötigt, korreliert ist.

4.2.1. Transportstudien mit isolierten Petersilie-Zellkernen

Mit Hilfe der beschriebenen Filtrationstechnik (2.8.1.) war es möglich, sowohl die RNA-Synthese als auch den Transport in vitro-synthetisierter RNA bei isolierten Petersilie-Zellkernen in Abhänigkeit von NTP und divalenten Kationen zu untersuchen (Großmann et al. 1979a, b).
Für eine Reihe von Zellkernen aus tierischen Geweben wurde ein antagonistischer Effekt von NTP und divalenten Kationen auf die RNA-Freisetzung festgestellt (Schneider 1959, Ishikawa et al. 1969, Chatterjee und Weißbach 1973,

Sauermann 1976). Es wurde gefolgert, daß ATP als Komplexbildner fungiert und Mg^{2+}-Ionen, die einen hemmenden Einfluß auf den RNA-Transport ausüben, durch Chelatbildung in ihrer Konzentration vermindert. Es wäre somit denkbar, daß ein Wechselspiel dieser beiden Komponenten die Translokation von RNA-Molekülen regulieren könnte. Andererseits wurde gezeigt, wie oben schon erwähnt, daß die NTP das Substrat für eine NTPase darstellen, die in den Porenkomplexen der Kernmembran lokalisiert und am RNA-Transport beteiligt sein soll (Franke 1974, Agutter et al. 1976, 1979).
Im Fall der isolierten Petersilien-Zellkerne ergab sich, daß die Freisetzung von neusynthetisierter RNA ins umgebende Medium dann stimuliert wird, wenn NTP und divalente Kationen in äquimolarer Konzentration vorliegen. Während NTP im Überschuß den gesteigerten RNA-Transport aufrechterhalten, führen zusätzliche divalente Kationen zu einer Hemmung der Freisetzung. Da Natriumpyrophosphat in Verbindung mit divalenten Kationen ebenso den RNA-Transport stimuliert, kann man davon ausgehen, daß auch bei Pflanzenzellen die Translokation der RNA durch einen antagonistischen Effekt von NTP und divalenten Kationen kontrolliert wird. Einerseits werden freie divalente Kationen, die den Transport hemmen, durch Bildung von Chelatkomplexen mit den Nucleotiden in ihrer Konzentration herabgesetzt, zum anderen würde gerade der Komplex aus NTP und divalentem Kation das Substrat für den Translokationsprozeß darstellen. Mit ansteigender Komplexkonzentration tritt jedoch Hemmung der RNA-Freisetzung ein.

4.3. Interaktion von NTP und divalenten Kationen bei der Transkription- und NTPase-Reaktion

Sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten stellen NTP die Vorstufen der RNA-Synthese dar, während divalente Kationen, besonders Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen, für die Aktivität der Polymerasen notwendig sind. Phosphatasen im Zellkern hingegen, speziell die NTPase, sind in der Lage die Konzentration dieser Vorstufenmoleküle durch enzymatischen Abbau herabzusetzen und als Produkt NDP und P_i entstehen zu lassen.

In wieweit nun eine Interaktion von NTP und deren Abbauprodukte und divalenten Kationen mitentscheiden bei der Regulation dieser Enzymkativitäten im Zellkern ist und in wieweit die Transkription mit der NTPase-Aktivität verknüpft ist, sollte ein Vergleich zeigen, bei dem die in vitro-Transkription isolierter Zellkerne und isolierter RNA-Polymerase I der NTPase-Aktivität der Zellkerne gegenübergestellt wurde.

In einem Versuch mit zunehmender NTP- und konstanter divalenter Kationenkonzentration wurde die RNA-Synthese isolierter Petersilie-Zellkerne stimuliert, wenn die Konzentration der NTP über die der divalenten Kationen im Inkubationsmedium anstieg. Gleichzeitig bot dieser Konzentrationsbereich der beiden Komponenten für die NTPase-Aktivität eine maximale Enzymgeschwindigkeit, während die in vitro-Transkription mit isolierter RNA-Polymerase I in diesem Bereich gehemmt wurde. Wir können daraus schließen, daß die sprunghafte Zunahme der in vitro-RNA-Synthese isolierter Zellkerne nicht primär auf einer Aktivitätsänderung der RNA-Polymerasen beruht, sondern eher Parallelen zur NTPase-Aktivität aufzeigt. Im übrigen ergab sich für die isolierte RNA-Polymerase II aus Sojabohne ein der Polymerase I entsprechendes Verhalten (nicht dargestellt).

Ganz im Gegensatz dazu steht das Ergebnis bei variabler Konzentration an divalenten Kationen bei konstanter sehr hoher NTP-Konzentration (1o mM). Auch hier erhielten wir eine Stimulation der RNA-Synthese isolierter Zellkerne bei äquimolarer Konzentration beider Komponenten. Diesmal aber konnte man auch für die RNA-Polymerase I mit ansteigender divalenter Kationenkonzentration eine Zunahme des UTP-Einbaus in fällbares Material verzeichnen, während die gemessene NTPase-Aktivität unter diesen Bedingungen konstant bleibt. Es scheint, als ob in diesem Fall die RNA-Polymerase-Aktivität ausschlaggebend für das Syntheseverhalten der Zellkerne ist.

Im folgenden Versuch bei ansteigender NTP- und divalenter Kationenkonzentration im Verhältnis 1 : 1 zueinander, nahm

die RNA-Synthese isolierter Zellkerne wieder zu, ebenfalls die NTPase-Aktivität, während die RNA-Polymerase I in diesem Konzentrationsbereich keine Aktivitätsänderung zeigte. Diese Ergebnisse erhärten die Schlußfolgerung, daß neben den RNA-Polymerasen die NTPase-Aktivität im Zellkern entscheidend das in vitro-Transkriptionsverhalten der isolierten Petersilie-Zellkerne mitprägt.
Aufschluß über eine Interaktion NTPase-Aktivität - RNA-Synthese konnte nur eine Untersuchung bringen, die den Einfluß der Substanzen berücksichtigt, die bei den beiden Reaktionen als Produkte erscheinen. ADP, ein Produkt, das bei der NTPase-Reaktion neben P_i entsteht, das aber im Zellkern nicht weiter dephosphoryliert werden kann, trug bei isolierten Zellkernen, wie auch im Fall der RNA-Polymerase I, zu einer leichten Hemmung der in vitro-Transkription bei. Eine ansteigende Pyrophosphatkonzentration im Inkubationsmedium rief hingegen eine Stimulation der RNA-Synthese isolierter Zellkerne hervor, während die RNA-Polymerase I-Aktivität drastisch gehemmt wurde. Es ist bekannt, daß der Vorgang der Transkription neben dem Einbau der Nucleosidmonophosphate in die fortlaufende RNA-Kette, die Freisetzung von Pyrophosphat zur Folge hat. Der Zellkern nun seinerseits weist eine sehr hohe Pyrophosphatase-Aktivität auf, die das freiwerdende Pyrophosphat in zwei Moleküle Orthophosphat zerlegt, um so zum einen einer Hemmung der Polymerasen vorzubeugen, zum anderen durch die enzymatische Spaltung Energie für den Transkriptionsprozeß bereitzustellen (Peller 1975). Man muß davon ausgehen, daß das im Versuch angebotene Pyrophosphat sehr rasch durch die Pyrophosphatase im Zellkern abgebaut wird. Dadurch kann die erhaltene Stimulation der RNA-Synthese isolierter Zellkerne nur auf einer Erhöhung des Orthophosphat-Pools im Zellkern beruhen (Großmann et al. 1979b). Die in den Experimenten auftretenden Unterschiede in der in vitro-Transkription isolierter Zellkerne und RNA-Polymerasen wären aus diesem Grund gerade dadurch zu erklären, daß die Phosphatase-Aktivität durch die Spaltung von NTP oder Pyrophosphat den Orthophosphat-Pool im Zellkern

erhöht. ADP dagegen kann nicht mehr enzymatisch dephosphoryliert werden und trägt somit nicht zu einer Erhöhung des Pools bei. Dieser Orthophosphat-Pool beeinflußt dabei nicht direkt die Polymerase-Aktivität, sondern könnte eher indirekt über eine Veränderung der Chromatinstruktur auf die Transkription einwirken.

Libanti und Tandler (1969) fanden sowohl bei tierischen als auch bei pflanzlichen Kernen eine sehr hohe Orthophosphatkonzentration. So konnte 3o - 5o % des gesamten Zellphosphats bei Mais im Nucleolus lokalisiert werden (o,5 - o,8 M P_i), während der Orthophosphat-Pool mehr als die Hälfte des totalen löslichen Phosphats der Zelle ausmacht. Die Kernhülle sollte dabei die Grenze zwischen einem P_i-reichen Kernkompartiment und einem P_i-armen Cytoplasma darstellen. Love et al. (1969) und Zbarskii (1969) folgerten aus ihren Ergebnissen, daß es die Aufgabe einer NTPase-Aktivität sein mußte, diesen Orthophosphat-Pool aufrechtzuerhalten und zu regulieren. Während die Akkumulation von Orthophosphat im Zellkern für Enzymaktivitäten notwendig sein sollte (Love et al. 1969), hielten Whitfield und Perris (1968) es für durchaus möglich, daß dieser hohe Orthophosphat-Pool die Assoziation und Dissoziation von Nucleinsäuren mit Proteinen beeinflussen könnte, um so die Chromatinstruktur reversibel zu disaggregieren und eine Aktivierung von reprimiertem Chromatin herbeizuführen. Denkbar wäre eine Auflösung der Superbead- Chromatinstruktur durch Disaggregation des H_1-Histons unter dem Einfluß der Orthophosphat-Ionen (Crothers, Yale, persönliche Mitteilung).

Isoliert man Petersilie-Zellkerne in wässrigen Medien, so enthalten diese keine freien anorganischen Phosphationen mehr. Es sollte daher eine Hypothese formuliert werden, die über den Aufbau eines Orthophosphat-Pools im Zellkern durch Phosphatase-Aktivität eine positive Beeinflussung der RNA-Synthese vorsieht. Diese Stimulation der in vitro-Transkription ist dabei nicht Ausdruck einer Veränderung auf Polymeraseebene, sondern in einer Modifikation der Chro-

matinstruktur und damit der Template-Eigenschaft zu suchen.

4.4. Enzymkinetische Studien an RNA-Polymerasen (Großmann und Seitz 1979)

Während sich unsere heutigen Vorstellungen über die Arbeitsweise der RNA-Polymerasen hauptsächlich auf Daten, die bei Escherichia coli-RNA-Polymerase erhalten wurden, stützen und den einzelnen Untereinheiten dieses Enzyms schon Funktionen zugeordnet werden konnten, ist bisher was Enzymkinetik, Funktion von Untereinheiten und Arbeitsweise anbetrifft bei eukaryontischen RNA-Polymerasen nur sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Enzymkinetik der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen näher untersucht werden, um von dieser Seite her mehr über dieses komplexe und für den Stoffwechsel äußerst wichtige Enzym aussagen zu können.

Aus Versuchen, die sowohl die Petersilien- als auch die Sojabohnen-RNA-Polymerase I unter dem Gesichtspunkt der Abhängigkeit von NTP und divalente Kationen betrachtet haben, konnten folgende Schlußfolgerungen gezogen werden: 1.) Das Substrat der RNA-Polymerase I ist der Komplex gebildet aus NTP und divalentem Kation. 2.) Divalente Kationen stellen notwendige Aktivatoren des Enzyms dar. 3.) NTP im Überschuß über das 1 : 1 Verhältnis von NTP und divalenten Kationen bedingen ein sigmoides Enzymverhalten bei unveränderter maximaler Enzymgeschwindigkeit. Diese Sigmoidität der Enzymkinetik weist auf ein allosterisch reguliertes Enzym hin. Während der Begriff des allosterischen Proteins früher so definiert wurde, daß einem allosterischen, regulierenden Zentrum das katalytische gegenübergestellt wurde (Monod et al. 1965), bezeichnet man heute ein Protein, das eine Interaktion solcher Zentren (Bindungsstellen für Liganden) aufweist als allosterisch, sogar wenn diese Zentren identisch sind (homologe Bindungsstellen). Die Interaktion homologer Bindungsstellen eines Proteins ist dabei verantwortlich für das Auftreten der Kooperativität, das heißt, der Affinitätsänderung der Bindungsstellen gegenüber ihren Liganden (siehe

Levitzki 1978). Zu untersuchen wäre an dieser Stelle, welche Kriterien überhaupt für ein allosterisches Enzym erfüllt sein müssen (siehe Dugal 1973).

1.) Allosterische Enzyme üben ihre katalytische Funktion in den allermeisten Fällen an Schlüsselstellungen des Stoffwechsels aus, also am Beginn von Synthese- und/oder Abbauwegen oder an Verzweigungsstellen. Damit kommt ihnen eine besondere regulatorische Bedeutung zu, sowohl im Sinne einer "Fein"- wie einer "Grobkontrolle". Die RNA-Polymerase I ist zuständig für die Synthese der rRNA und ist somit maßgeblich am Aufbau der Ribosomen beteiligt, die in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen müssen, um die Voraussetzung für ein flexibles Stoffwechselverhalten der Zelle gewährleisten zu können.

2.) Sie zeigen sigmoide Kinetiken im Diagramm Reaktionsgeschwindigkeit/Ligandenkonzentration.

3.) Allosterische Enzyme bestehen aus mindestens zwei Untereinheiten, die in gesetzmäßiger Weise miteinander kooperieren. Die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen besteht aus 2 hochmolekularen und 4 - 6 niedermolekularen Untereinheiten.

4.) Im sogenannten Hill-Diagramm weisen sie eine Gerade mit der Steigung $n \neq 1$ auf. Dieser Wert ist ein Maß für die Wechselbeziehung zwischen Bindungszentren, letztlich also ein Maß für die Kooperativität. Die Kinetik der Petersilien- und Sojabohnen-RNA-Polymerase I ergibt im Hill-Diagramm Geraden mit gleicher Steigung, die aber einen Knick aufweisen. Dies bedeutet, daß bis zu einer Substratkonzentration von o,3 mM die Steigung ($n = o,67$) für eine negative Kooperativität von Bindungsstellen sprechen könnte, während bei höheren Substratkonzentrationen eine Steigung von $n = 4,7$ auf eine positive Kooperativität hinweist, so daß die Anlagerung von Substratmolekülen an die Substratbindungsstellen der Enzymuntereinheiten erleichtert wäre. Außerdem kann man dieser Steigung entnehmen, daß minimal 4 - 5 Substratbindungsstellen miteinander in Wechselwirkung treten und diese Anzahl der Bindungsstellen vielleicht in Analogie zu den niedermolekularen Enzymuntereinheiten gesehen werden

können.
Es ist deshalb für die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen festzustellen, daß die Kriterien, die für ein allosterisches Enzym gelten, erfüllt sind. Es stellt sich aber die Frage, ob die Kooperativität der Polymeraseuntereinheiten ein für die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen spezifisches Merkmal darstellt, oder ob die Prokaryonten-RNA-Polymerase ebenfalls zu den allosterischen Enzymen gerechnet werden muß.

Die aktive Form der Prokaryonten-RNA-Polymerase, das Holoenzym, besteht aus 5 verschiedenen Untereinheiten ß, ß', σ, α und ω mit den Molekulargewichten 150 000, 160 000, 90 000, 40 000 und 10 000, von denen nur α doppelt vorhanden ist. Die Untereinheiten werden über sekundäre Bindungen zusammengehalten; man findet keine kovalente Verknüpfungen. Der sogenannte σ-Faktor ist für das Auffinden der Promotorregion verantwortlich, während ß' offenbar für die Wechselwirkung des Enzyms mit der DNA notwendig ist.
Ein Versuch, bei dem die in vitro-Transkription der E.coli-RNA-Polymerase in Abhänigkeit von NTP über dem 1 : 1 Verhältnis betrachtet wurde, ergab ebenfalls ein sigmoides Enzymverhalten, mit einer im Hill-Diagramm ermittelten Steigung von n = 1,77. Das spricht dafür, daß auch bei dieser Polymerase eine Kooperativität vorliegt, die auf eine Wechselwirkung von minimal 2 Untereinheiten schließen läßt.

Es wurde schon häufiger erwähnt, daß der Zellkern Sitz einer sehr potenten NTPase-Aktivität ist. Die Frage warf sich nun auf, welchen Einfluß die Produkte dieser NTPase, NDP und P_i, anstelle von NTP im Überschuß über die divalenten Kationen auf die in vitro-Transkription ausüben. Ein Versuch unter diesen Bedingungen ergab Michaelis-Menten-Kinetik für die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen. Während also NTP im Überschuß über die divalenten Kationen ein allosterisches Enzymverhalten bedingt, erhalten wir mit NDP und P_i Michaelis-Menten-Kinetik. Dies legt den Schluß nahe, daß eine enzymatische Spaltung von NTP zu NDP und P_i den hemmenden Effekt der freien NTP-Konzentration auf die RNA-Synthese verhindert.

4.5. Enzymkinetische Studien mit der NTPase isolierter Petersilie-Zellkerne

Aus Experimenten, die die NTPase-Aktivität isolierter Petersilie-Zellkerne in Abhänigkeit von NTP und divalenten Kationen betrachtet haben, konnte gefolgert werden, daß der Komplex aus NTP und divalentem Kation das Substrat darstellt. Mg^{2+}-Ionen fungieren als apparente kompetitive Inhibitoren, während ATP als Aktivator der NTPase anzusehen ist. Vergleicht man nun den Einfluß der NTP und der divalenten Kationen auf die NTPase-Aktivität mit dem auf die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen, so ist zu erkennen, daß umgekehrte Verhältnisse vorliegen. NTP im Überschuß über die äquimolare Konzentration von NTP und divalenten Kationen hemmt die Polymerase-Aktivität und bedingt sigmoide Enzymkinetik, wogegen die NTPase-Aktivität im Zellkern unter diesen Bedingungen stark gefördert wird, was in einer Verringerung des K_m-Werts um den Faktor 1oo zum Ausdruck kommt. Diese Dephosphorylierung von NTP zu NDP und P_i resultiert jedoch in einer Änderung des Enzymverhaltens der Polymerase; der sigmoide Charakter geht in eine Michaelis-Menten-Kinetik über. Durch die Abnahme der NTP, die divalente Kationen weit besser komplexieren können als NDP und P_i, steigt der Anteil nicht-komplexierter divalenter Kationen an, was sich in einer Hemmung der NTPase-Aktivität bemerkbar macht. Ein solches Wechselspiel trägt zum einen über die Kontrolle des NTP-Pools im Zellkern zur Regulation der RNA-Polymerase I bei, zum anderen aber verhindert es einen übermäßigen Abbau und Verarmung des NTP-Pools im Zellkern und in der Zelle selbst. Deutlich sollte nochmals hervorgehoben werden, daß zum Unterschied zu dem vorher beschriebenen Einfluß des Orthophosphat-Pools auf die Chromatinstruktur und der damit verbundenen Stimulation der RNA-Synthese im Zellkern, diese Interaktion NTPase - Polymerase als eine reine Regulation auf Enzymebene angesehen werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Regulation der Transkription und des RNA-Transports bei höheren Pflanzen führten zu folgenden Ergebnissen:

1.) Die Isolierung und Reinigung von Zellkernen, Chromatin und RNA-Polymerase I aus einer Suspensionskultur von Petroselinum crispum wurde ausgearbeitet.

2.) Die Zellkerne sind in der Lage in vitro RNA zu synthetisieren, was über den Einbau von [^{3}H] UTP in säurefällbares Material und durch elektrophoretische Auftrennung der Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden konnte.

3.) Mit Hilfe eines neuentwickelten Filtrationsverfahrens lassen sich sowohl Transkription als auch RNA-Transport bei isolierten Petersilie-Zellkernen gleichzeitig untersuchen.

4.) Die Freisetzung von neusynthetisierter RNA aus den isolierten Zellkernen wird stimuliert, wenn NTP und divalente Kationen in äquimolarer Konzentration vorliegen. Während NTP über dieses Verhältnis den gesteigerten RNA-Transport aufrechterhalten, führen zusätzliche divalente Kationen zu einer Hemmung. Ein antagonistischer Effekt zur Kontrolle des RNA-Transports wird diskutiert, bei dem der Komplexierungseigenschaft der NTP und dem daraus resultierenden Wegfangen der hemmenden Kationen die Bedeutung des Komplexes als Substrat für den Translokationsprozeß gegenübergestellt wird.

5.) Untersuchung der Phosphatase-Aktivität, speziell die NTPase, bei isolierten Petersilie-Zellkernen in Abhängigkeit vom Substratangebot, der Inkubationsdauer, dem pH-Wert und von Phytohormonen.

6.) Charakterisierung der RNA-Polymerase I aus Petersilie. Untersucht wurde der Einfluß von Ionen (Mg^{2+}, Mn^{2+}), der Ionenstärke, der Matrizen-DNA, verschiedenen Phytohormonen, die Untereinheitenstruktur des Enzyms und seine in vitro-Transkriptionsprodukte. Weiter konnte das Enzym elektronenmikroskopisch dargestellt werden.

7.) Auftrennung und Reinigung von Sojabohnen-RNA-Polymerase I mit Hilfe von an Sepharose gekoppelter Plasmid-DNA, die die rDNA-Cistrons als "Insert" enthält.

8.) Um eine Regulation der RNA-Polymerase I vom Substratangebot her zu untersuchen, wurde der Einfluß von NTP und divalenten Kationen auf die in vitro-Transkription der Petersilien-RNA-Polymerase I getestet. Es erwies sich dabei, daß die Polymerase in einem Konzentrationsbereich von 4 - 11 mM NTP und divalente Kationen im Verhältnis 1 : 1 zueinander keine Aktivitätsänderung zeigt. Waren NTP zusätzlich im Inkubationsmedium, wurde die Enzymaktivität gehemmt, waren divalente Kationen im Überschuß wurde sie stimuliert.

9.) Vergleicht man die in vitro-Transkription isolierter Petersilie-Zellkerne und isolierter RNA-Polymerase I mit der NTPase-Aktivität der Zellkerne in Abhänigkeit von unterschiedlicher NTP- und divalenter Kationenkonzentration, so kann eine Interaktion der Enzyme festgestellt werden. Die Rolle des Orthophosphat-Pools im Zellkern und seine Regulation durch die NTPase wird im Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Chromatinstruktur und der daraus resultierenden Änderung der Transkriptionsrate diskutiert.

1o.) Enzymkinetische Studien an RNA-Polymerase I aus Petersilie bewiesen, daß das Substrat des Enzyms der Komplex aus NTP und divalentem Kation darstellt. Divalente Kationen werden als notwendige Aktivatoren benötigt, während nicht-komplexierte NTP ein sigmoides Enzymverhalten bedingen. Die Ergebnisse konnten mit RNA-Polymerase I aus Sojabohnen-Hypokotyl bestätigt werden. Die Sigmoidität der Enzymkinetik beider Polymerasen und ihre Darstellung im Hill-Diagramm lassen darauf schließen, daß die RNA-Polymerase I höherer Pflanzen ein allosterisch regulierbares Enzym ist, das eine Kooperativität der Untereinheiten zeigt.

11.) Ersetzt man die NTP-Konzentration, die im Überschuß über die divalenten Kationen vorliegt und ein allosterisches Enzymverhalten bedingt, durch NDP und P_i, so tritt Michaelis-Menten-Kinetik für die RNA-Polymerase I auf.

12.) Enzymkinetische Studien mit der NTPase isolierter Petersilie-Zellkerne ergaben, daß der Komplex aus NTP und divalentem Kation das Substrat darstellt. Im Unterschied zu der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen jedoch fungieren Mg^{2+}-Ionen als apparente kompetitive Inhibitoren, während ATP als Aktivator der NTPase anzusehen ist.

13.) Es wird die Hypothese formuliert, daß ein enzymatischer Abbau der freien NTP zu NDP und P_i, katalysiert durch die NTPase im Zellkern, in einer Änderung des Enzymverhaltens der RNA-Polymerase I resultiert. Eine solche Interaktion trägt über die Kontrolle des NTP-Pools im Zellkern zur Regulation der RNA-Polymerase I höherer Pflanzen bei.

6. Literaturverzeichnis

Agutter, P.S., McArdue, H.J., and McCaldin, B. 1976: Evidence for involvement of nuclear envelope nucleoside triphosphatase in nucleocytoplasmic translocation of ribonucleoprotein. Nature 263, 165 - 167

Agutter, P.S., Cockrill, J.B., Lavine, J.E., McCaldin, B., and Sim, R.B. 1979: Properties of mammalian nuclear-envelope nucleoside triphosphatase. Biochem. J. 181, 647 - 658

Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., Bähr, W., Frischauf, A.M., and Marquardt, M. 1975: Covalent attachment of DNA to agarose. Improved synthesis and use in affinity chromatography. Eur. J. Biochem. 54, 411 - 418

Biswas, B.B., Ganguly, A., and Das, A. 1975: Eukaryotic RNA polymerases and the factors that control them. Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 15, 145 - 184

Bjerrum, J., Schwarzenbach, G., and Sillen, L.G. 1958: Stability Constants: The Chemical Society, Special Publication No. 7, London

Blaschek, W., Hess., D., and Hoffmann, F. 1974: Transkription in aus Protoplasten isolierten Zellkernen von Nicotiana und Petunia. Z. Pflanzenphysiol. 72, 262 - 271

Burgess, R.R. 1971: RNA polymerase. Ann. Rev. Biochem. 4o,711

Burgess, A.B., and Burgess, R.R. 1974: Purification and properties of two RNA polymerases from Physarum polycephalum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1174 - 1177

Chambon, P. 1975: Eukaryotic nuclear RNA polymerases. Ann. Rev. Biochem. 44, 613 - 638

Chatterjee, N.K., and Weissbach, H. 1973: Release of RNA from HeLa cell nuclei. Arch. Biochem. Biophys. 157, 16o - 167

Coleman, J.R. 1965: Biochemical and cytochemical demonstration of adenosine triphosphatase activity in nuclei. J. Cell. Biol. 27, 2oA - 21A

Cox, B.J., and Turnock, G. 1973: Synthesis and processing of ribosomal RNA in cultured plant cells. Eur. J. Biochem. 37, 367 - 376

Dierks-Ventling, C., and Bierri-Bonniot, F. 1976: DNA-dependent RNA polymerase I and II activation by 17ß - estradiol receptor complex on liver chromatin from immature chicks. In "Molecular mechanisms in the control of gene expression" (Nierlich, D.P., Rutter, W.J., and Fox, C.F., Eds.) 337 - 347, Acad. Press, New York

Duda, C.T. 1976: Plant RNA polymerases. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 119 - 132

Dugal, B.S. 1973: Allosterie und Cooperativität bei Enzymen des Zellstoffwechsels. Bio. in uns. Zeit 3, 42 - 49

Fischer, F., Siebert, G., and Adloff, E. 1959: Characterisierung von zwei Adenosintriphosphatasen in Schweinenieren - Zellkernen. Biochem. Zeitschr. 332, 131 - 15o

Franke, W.W. 1974: Structure, biochemistry, and functions of the nuclear envelope. Int. Rev. Cytol. Suppl. 4, 71 - 263

Georgiev, Nedospasov, and Bakayer 1978: Supranucleosomal levels of chromatin organization. The cell nucleus VI, Chromatin Part C (Busch, H. Ed.), 4, Acad. Press, New York

Gerhart, J.C. 197o: A discussion of the regulatory properties of aspertate transcarbamylase from Escherichia coli. Current Topics in Cellular Regulation (Horecker, B.L., Stadtman, E.R., Eds.) 2, Acad. Press, New York

Gradmann, D., and Slayman, C.L. 1975: Oscillations of an electrogenic pump in the plasma membrane of Neurospora. J. Membrane Biol. 23, 181 - 212

Großmann, K. 1978: In vitro RNS-Synthese und RNS-Transport bei isolierten Kernen einer Suspensionskultur. Diplomarbeit, Tübingen

Großmann, K., Seitz, U., and Seitz, H.U. 1979a: Transcription and release of RNA in isolated nuclei from parsley cells. Z. Naturforsch. 34c, 431 - 435

Großmann, K., Haschke, H.P., Seitz, U., and Seitz, H.U. 1979b:

Synthesis and release of RNA by isolated nuclei of plant cells in relation to nucleoside triphosphates and divalent cations. Pl. Syst. Evol., Suppl. 2, 163 - 177

Großmann, K., Haschke, H.P., and Seitz, H.U. 1979: RNA synthesis in higher plant cells. Poster, Abstract bei 5. EMBO annual symposium, Heidelberg, 12. - 15.1o.

Großmann, K., and Seitz, H.U. 1979: RNA polymerase I from higher plants. Evidence for allosteric regulation and interaction with a nuclear phosphatase activity controlled NTP pool. Nucl. Acids. Res. 7, 2o15 - 2o29

Großmann, K., Friedrich, H., and Seitz, H.U. 198o: Purification and characterisation of chromatin - bound DNA - dependent RNA polymerase I from Petroselinum crispum. Influence of nucleoside triphosphates. Zur Veröffentlichung abgesandt.

Grummt, I., and Grummt, F. 1976: Control of nucleolar RNA synthesis by the intracellular pool sizes of ATP and GTP. Cell 7, 447 - 453

Guilfoyle, T.J., and Hanson, J.B. 1973: Increased activity of chromatin - bound ribonucleic acid polymerase from soybean hypocotyl with spermidine and high ionic strength. Plant Physiol. 51. 1o22 - 1o25

Guilfoyle, T.J. 1976: Purification and characterization of DNA - dependent RNA polymerases from cauliflower nuclei. Plant Physiol. 58, 453 - 458

Guilfoyle, T.J., and Key, J.L. 1976: Purification and characterization of soybean DNA - dependent RNA polymerases and the modulation of their activities during development. Nucl. Acids and Protein Synthesis in Plants, Plenum Press, New York, 37 - 63 (Bogorad, L., Weil, J.H. Eds.)

Guilfoyle, T.J., Lin, C.Y., Chen, Y.M., and Key, J.L. 1976: Purification and characterization of RNA polymerase I from a higher plant. Biochim. Biophys. Acta 418, 344 - 357

Gurley, W.B., Lin, C.Y., Guiloyle, T.J., Nagao, R.T., and Key, J.L. 1976: Analysis of plant RNA polymerase I transcript in chromatin and nuclei. Biochim. Biophys. Acta 479, 246 - 255

Hamilton, R.H., Künsch, U., and Pemperli, A. 1972: Simple rapid procedures for isolation of tobacco leaf nuclei. Analyt. Biochem. 49, 48 - 57

Hemleben, V., Ermich, N., Kimmich, D., Leber, B., and Peter, G. 1975: Fate of homologous DNA in seedlings of Matthiola. Eur. J. Biochem. 56, 4o3 - 411

Hershey, H.V. 1977: Nature of DNA synthesized in the presence of ATP in isolated nuclei. Biochim. Biophys. Acta 479, 246 - 255

Huang, R.C., and Bonner, J. 1962: Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. Biochemistry 48, 1216 - 1222

Ishikawa, K., Kuroda, C., and Ogata, K. 1969: Release of ribonucleoprotein particles containing rapidly labelled ribonucleicacid from rat liver nuclei. Effect of adenosine 5'- triphosphate and some properties of the particles. Biochim. Biophys. Acta 179, 316 - 331

Jacobsen, J.V. 1977: Regulation of ribonucleic-acid metabolism by plant homones. Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 537 - 564

Jendrisak, J.J., and Burgess, R.R. 1975: A new method for the large-scale purification of wheat germ DNA-dependent RNA polymerase II. Biochemistry 14, 4639 - 4645

Jendrisak, J.J. 1979: Purification, structures and functions of RNA polymerases from higher plants. Genome Organisation and Expression in Plants, Nato-, FEBS-Workshop, Edinburgh 11. - 21. July

Kende, H., and Gardner, G. 1976: Hormon binding in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 267 - 29o

Koller, and Sogo, I.M. 1974: An electron microscopic method for studying nucleic acid-protein complexes. Visualization of RNA polymerase bound to the RNA of bacteriophages T 7 and T 3. Biopolymers 13, 995 - 1009

Kuehn, G.D., Affolter, H.U., Altmar, V.J., Seebeck, T., Gubler, U., and Braun, R. 1979: Polyamine-mediated phosphorylation of a nucleolar protein from Physarum polycephalum that stimulates rRNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2541 - 2545

Laemmli, U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680 - 685

Levitzki, A. 1978: Quantitative aspects of allosteric mechanisms. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 28. Springer, New York

Libanti, C.M., and Tandler, C.J. 1969: The distribution of the water-soluble inorganic orthophosphate within the cell. Accumulation in the nucleus. J. Cell Biol. 42, 754 - 765

Lin, C.Y., Guilfoyle, T.J., Chen, Y.M., Nagao, R.T., and Key, J.L. 1974: The separation of RNA polymerases I and II achieved by fractionation of plant chromatin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 498 - 506

Lin, C.Y., Guilfoyle, T.J., Chen, Y.M., and Key, J.L. 1975: Isolation of nucleoli and localization of ribonucleic acid polymerase I from soybean hypocotyl. Plant Physiol. 56, 850 - 852

Lin, T., and Morales, M.F. 1977: Application of a one-step procedure for measuring in organic phosphate in the presence of proteins. The actomyosin ATPase system. Analyt. Biochem. 77, 10 - 17

Lindell, T.J., Weinberg, F., Morris, P.W., Roeder, R.G., and Rutter, W.J. 1970: Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by α-amanitin. Science 170, 447 - 448

Link, G., and Richter, G. 1975: Properties and subunit composition of RNA polymerase II from plant cell cultures. Biochim. Biophys. Acta 395, 337 - 346

Loening, U.E. 1969: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. The effect of changes in conformation. Biochem. J. 113, 131 - 138

Love, R., Studzinski, G.P., and Walsh, R.J. 1969: Nuclear, nucleolinar and cytoplasmic acid phosphatases in cultured mammalian cells. Exp. Cell Res. 58, 62 - 72

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Maizel, J.V. 1969: Acrylamide gel electrophoresis of proteins and nucleic acids. In "Fundamental Techniques in Virology" 334 - 362, Acad. Press

Mennes, A.M., Voogt, E., and Libbenga, K.R. 1977: The isolation of nuclei from cultured tobacco pith explants. Plant Sci. Lett. 8, 171 - 177

Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.P. 1965: On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88 - 118

Morrison, J.F. 1979: Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes. Methods in Enzymology 63, Enzym Kinetics and Mechanism Part A (Purich, D.L. Ed.) 257 - 294

Mullinix, K.P., Strain, G.C., and Bogorad, L. 1973: RNA polymerases of maize. Purification and molecular structure of DNA-dependent RNA polymerase II. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 7o, 2386 - 239o

O'Malley, B.W., and Means, A.R. 1974: Female steroid hormones and target cell nuclei. Science 183, 61o - 62o

Peller, L. 1975: In vitro RNA synthesis should be coupled

to pyrophosphate hydrolysis. Bioch. Biophys. Res. Com. 63, 912 - 916

Philipp, E.I., Franke, W.W., Keenan, T.W., Stadler, J., and Jarasch, E.D. 1976: Characterization of nuclear membranes and endoplasmic reticulum isolated from plant tissue. J. Cell Biol. 68, 11 - 29

Rapaport, E., Garcia-Blanco, M.A., and Zamecnik, P.C. 1979: Regulation of DNA replication in S-phase nuclei by ATP and ADP pools. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1643 - 1647

Roeder, R.G., and Rutter, W.J. 1969: Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. Nature 224, 234 - 237

Sauermann, G. 1976: Studies on ribonucleic acid metabolism using nuclear columns. Release of rapidly labelled RNA from rat liver nuclei. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 357, 1117 - 1124

Schneider, J.H. 1959: Factors affecting the release of nuclear ribonucleic acid from the nucleus in vitro. J. Biol. Chem. 234, 2728 - 2732

Schwartz, L.B., and Roeder, R.G. 1974: Purification and subunit structure of desoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase I from the mouse myeloma, MOPC 315. J. Biol. Chem. 249, 5898 - 5906

Schwartz, L.B., Sklar, V.E.F., Jaehning, J.A., Weinmann, R., and Roeder, R.G. 1974: Isolation and partial characterization of the multiple forms of desoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. J. Biol. Chem. 249, 5889 - 5897

Seitz, H.U., and Richter, G. 1970: Isolierung und Charakterisierung schnell markierter HnRNA aus frei suspendierten Calluszellen der Petersilie. Planta 92, 309 - 326

Seitz, U. and Seitz, H.U. 1979: The molecular weight of

rRNA precursor molecules and their processing in higher plant cells. Z. Naturforsch. 34c, 253 - 258

Shifrin, N., and Levine, L. 1968: Cytochemical adenosinetriphosphatase in plant root meristem. J. Cell Sci. 3, 423 - 436

Siebert, G. 1963: Enzyme of cancer nuclei. Exp. Cell Res. Suppl. 9, 389 - 417

Siebert, G. 1968: Nucleus. In Florkin, M., Stotz, E.H., (Eds.): Comprehensive Biochemistry 23, 1 - 37. Amsterdam-New York-London: Elsevier Publishing Company

Slater, R.J., Venis, M.A., and Grierson, D. 1978: Characterization of ribonucleic acid synthesis by nuclei isolated from Zea mays. Planta 144, 89 - 93

Spiess, E., and Seitz, U. 1975: Quantitative Bestimmung der wachstumsbedingten Veränderungen in der Ultrastruktur von frei suspendierten Kalluszellen der Petersilie. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 88, 319 - 328

Stärk, D., Hannover, R., and Siebert, G. 1978: Nucleotides and coenzymes in nuclei isolated from rat liver. Hoppe-Seylers Z. Physiol. 359, 1203 - 1208

Stein, G.S., Park, W., Thrall, C., Mans, R., and Stein, J. 1975: Regulation of cell-cycle stage-specific transcription of histone genes from chromatin by nonhistone chromosomal proteins. Nature 257, 764 - 767

Storer, A.C., and Cornish-Bowden, A. 1976: Concentration of $MgATP^{2-}$ and other ions in solution. Calculation of the true Concentrations of species present in mixtures of associating ions. Biochem. J. 159, 1 - 5

Sutherland, E.W. 1972: Untersuchungen zur Wirkungsweise der Hormone. Angew. Chem. 84, 1117 - 1126

Volloch, V.Z., Rits, S., and Tumerman, L. 1979: A possible mechanism responsible for the correction of transcrip-

tion errors. Nucl. Acids Res. 6, 1535

Vorbrodt, A. 1974: Cytochemistry of Nuclear Enzymes. In "The Cell Nucleus" III (Busch, H. Ed.), 8, 3o9 - 34o, Acad. Press

Wackernagel, W. 1978: C. Genetics, I Replication. Progress in Botany 4o, 197

Whitfield, J.F., and Perris, A.D. 1968: Dissolution of the condensed chromatin structures of isolated thymocyte nuclei and the disruption of desoxyribonucleoproteins by inorganic phosphate and a phosphoprotein. Exp. Cell Res. 49, 359 - 372

Young, H.A., and Whiteley, H.R. 1975: Desoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases in the dimorphic fungus Mucor rouxii. J. Biol. Chem. 25o, 479 - 487

Zbarskii, I.B. 1969: Usp. Sovrem. Biol. 67, 323 - 333

Zimmermann, H.P. 1977: Localization of nucleoside triphosphates on chromosome of HeLa cells. Cytobiologie 16, 91 - 97

Zylber, E.A., and Penman, S. 1971: Products of RNA polymerases in HeLa cell nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2861 - 2865

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz und Frau Dr. U. Seitz, daß sie mir die Durchführung dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht haben und mir hilfreich zur Seite gestanden sind.
Herrn H. Friedrich (Lehrstuhl für Genetik, Tübingen) und Herrn Dr. H.P. Haschke danke ich herzlich für ihre großzügige Zusammenarbeit, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihr reges Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Besonderen Dank möchte ich Herrn H. Friedrich sagen, der mir freundlicherweise die Sojabohnen-RNA-Polymerase I zukommen ließ.
Herrn Dr. A. Brennicke und Herrn H. Schoppmann (Lehrstuhl für spezielle Zoologie, Tübingen) danke ich für ihre Hilfe bei der elektronenmikroskopischen Arbeit.

Für sehr anregende Gespräche danke ich Prof. Dr. J. Key (Athens, Georgia), Prof. Dr. G. Siebert (Würzburg), Dr. H. Lörz (FMI, Basel) und Dr. C. Ventling (FMI, Basel).

Für die Unterstützung im Labor und für die sehr menschliche und freundliche Atmosphäre, ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre, danke ich besonders Frau G. Sieber, Herrn C. Langebartels und Herrn W. Noe.

Lebenslauf

08.08. 1953	geboren in Heilbronn/N. als Sohn des Max Großmann, Malermeister, und seiner Frau Gisela Großmann, geb. Knoll
1960 - 1964	Wartbergschule Heilbronn (Grundschule)
1964 - 1972	Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn
1972	Abitur
1972 - 1978	Biologiestudium, Universität Tübingen
1974	Vordiplom
1978	Diplom. Diplomarbeit in Biologie über das Thema "In vitro-RNS-Synthese und RNS-Transport bei isolierten Kernen einer Suspensionskultur" unter der Anleitung von Prof. Dr. H.U. Seitz.
1978 - 1980	Dissertation am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie und allgemeine Botanik im Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H.U. Seitz über das Thema "Regulation der Transkription und des RNA-Transports höherer Pflanzen".
1976	Wissenschaftliche Hilfskraft (in der Lehre tätig)
1978 - 1980	Wissenschaftlicher Angestellter im Rahmen eines Schwerpunktprogramms der DFG.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten Ammermann, Bardele, Bentrup, Bießmann, Braun, Engelmann, Frank, Grell, Guglielmi, Hager, Hausen, Hemleben, Meyer, Netzel, Probst, Renz, Rieker, Sander, Schwemmle, Seiler, Seitz, Seyffert, Wöhrmann, Zähner.